



Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa

Gamopatias Monoclonais: da Colheita ao Diagnóstico Laboratorial

Relatório de Atividade Profissional para a Obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Júri:

Presidente: Doutora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa;

Orientadora: Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa;

Arguente: Doutora Armandina Maria Soares Madeira Miranda, Farmacêutico, Assessor Sénior do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Ana Teresa Fernandes Durão

Novembro 2020

Copyright© AnaTeresa Fernandes Durão

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

Agradeço a todos que me ajudaram na realização desta tese, mais concretamente à minha família, que sempre me incentivou e aos meus verdadeiros amigos: Juca, Pisca, Jô e Piki.

Quero também dedicar este relatório ao meu pai que apesar de não estar comigo, está sempre, sempre ao meu lado.... tenho a certeza.

Resumo

Com o presente relatório de atividade profissional a autora tem o objectivo de obter o Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina, pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Neste relatório é descrita a atividade desempenhada na função de Técnica Superior de Laboratório nos últimos cinco anos no Laboratório Dr. Branco Lisboa e posteriormente no posto de colheitas do Laboratório Dr. Joaquim Chaves em Caldas da Rainha.

O seu percurso profissional permitiu-lhe desenvolver atividades nas diferentes áreas do Laboratório Clínico: Hematologia e Coagulação, Bioquímica, Endocrinologia e Imunologia e Microbiologia, bem como na realização de colheitas de diferentes amostras biológicas. Participou ativamente no processo de certificação do Laboratório Dr. Branco Lisboa, que no último ano foi adquirido pelo Laboratório Dr. Joaquim Chaves e que transformou o laboratório em posto de colheitas.

O atual relatório tem como foco principal a importância da fase pré-analítica na obtenção de uma amostra biológica viável para a aplicação de técnicas laboratoriais, como a eletroforese de proteínas séricas e a caracterização das proteínas por Imunofixação, no diagnóstico de gamopatias monoclonais.

Abstract

With this professional activity report, the author aims to obtain the Master's Degree in Molecular Genetics and Biomedicine, by the Faculty of Sciences and Technology, Universidade Nova de Lisboa. This report describes the activity performed in the role of Superior Laboratory Technician in the last five years at the Dr. Branco Lisboa Laboratory and later at the Dr. Joaquim Chaves Laboratory in Caldas da Rainha.

Her professional career allowed her to develop activities in the different areas of the Clinical Laboratory: Hematology and Coagulation, Biochemistry, Endocrinology and Immunology and Microbiology, as well as in the collection of different biological samples. She also actively participated in the certification process of the Dr Branco Lisboa Laboratory, which in the last year was acquired by the Dr Joaquim Chaves Laboratory, which changed the laboratory to become a collection station.

The current report has it's main focus in the importance of the preanalytical phase to obtaining a viable biological sample for the application of laboratory techniques, such as electrophoresis of serum proteins and the characterization of proteins by immunofixation, in the diagnosis of monoclonal gammopathies.

Índice

| | |
|---------------------|-----|
| Agradecimentos..... | i |
| Resumo..... | ii |
| Abstrat..... | iii |

| | |
|-----------------|---|
| Introdução..... | 1 |
|-----------------|---|

Parte I

| | |
|----------------------------|---|
| Percurso profissional..... | 2 |
|----------------------------|---|

| | |
|----------------------------------|---|
| 1. Experiência Profissional..... | 2 |
|----------------------------------|---|

| | |
|----------------------------------------------------------------|---|
| 1.1 Estágio Profissional no Laboratório Dr. Branco Lisboa..... | 2 |
|----------------------------------------------------------------|---|

| | |
|--------------------------------------------------------------------|---|
| 1.2 Experiência profissional no Laboratório Dr. Branco Lisboa..... | 2 |
|--------------------------------------------------------------------|---|

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| 1.3 Experiência Profissional no posto de colheitas do Laboratório Dr Joaquim Chaves, em Caldas da Rainha..... | 3 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

| | |
|-----------------------------------|---|
| 2. Composição Organizacional..... | 3 |
|-----------------------------------|---|

| | |
|----------------------------------------|---|
| 2.1 Laboratório Dr. Branco Lisboa..... | 3 |
|----------------------------------------|---|

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---|
| 2.2 Posto de Colheitas do Laboratório Dr. Joaquim Chaves em Caldas da Rainha..... | 3 |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---|

Parte II

| | |
|----------------------------------------------------|---|
| 1. A Flebotomia e a atividade de Flebotomista..... | 4 |
|----------------------------------------------------|---|

| | |
|------------------------------------------------------------------------|---|
| 2. Aspectos a considerar antes da colheita de amostras biológicas..... | 5 |
|------------------------------------------------------------------------|---|

| | |
|---------------------------------|---|
| 2.1 Preparação do Paciente..... | 5 |
|---------------------------------|---|

| | |
|-------------------------------------------------------------|---|
| 2.2 Fatores que influenciam o estado basal do paciente..... | 6 |
|-------------------------------------------------------------|---|

| | |
|-----------------------------------------------|---|
| 2.3 Colheita de Sangue por Punção Venosa..... | 7 |
|-----------------------------------------------|---|

| | |
|----------------------------------------|----|
| 3. Triagem de Produtos Biológicos..... | 11 |
|----------------------------------------|----|

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Preparação das amostra colhidas..... | 11 |
| 3.1.1 Obtenção da Amostra de Soro..... | 13 |
| 3.2 Triagem de amostras biológicas usando o Process System Managemant..... | 14 |

Parte III

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Resposta Imunitária responsável pela síntese de imunoglobulinas..... | 16 |
| 1.1 Maturação dos Linfócitos B..... | 17 |
| 2. Imunoglobulinas..... | 18 |
| 2.1 Estrutura e Classificação das Imunoglobulinas..... | 19 |
| 2.2 Alterações nas Imunoglobulinas..... | 21 |

Parte IV

| | |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 1. Proteínas Séricas..... | 22 |
| 2. Determinação de proteínas séricas por eletroforese..... | 22 |
| 2.1 Eletroforese em Acetato de Celulose e Gel de Agarose..... | 25 |
| 2.2 Eletroforese por Capilaridade..... | 26 |
| 3. Eletroforese das Proteínas: Interpretação gráfica..... | 29 |
| 4. Interferências na eletroforese de proteínas séricas..... | 35 |
| 4.1 Fatores Endógenos de Interferência..... | 35 |
| 4.1.1 Fibrinogénio..... | 35 |
| 4.1.2 Hemólise..... | 36 |
| 4.1.3 Crioglobulinas..... | 37 |
| 4.1.4 Subclasses IgD4 elevadas..... | 37 |
| 4.2 Fatores Exógenos de Interferência..... | 38 |
| 4.2.1 Contraste radiológico..... | 38 |
| 4.2.2 Terapia monoclonal com imunoglobulinas..... | 38 |

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 5. Imunoeletroforese e Imunofixação das Proteínas Séricas..... | 38 |
| 5.1 Imunoeletroforese das Proteínas Séricas..... | 38 |
| 5.2 Imunofixação das Proteínas Séricas..... | 39 |
| 5.3 Interpretação de Imunofixação das Proteínas Séricas..... | 41 |
| 6.Outros testes utilizados no diagnóstico de Gamopatias..... | 43 |
| 6.1 Eletroforese e Imunofixação Urinária..... | 43 |
| 6.2 Proteína Bence Jones..... | 45 |
| 6.3 Doseamento de cadeias leves livres..... | 46 |

Parte V

| | |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Gamopatias monoclonais benignas..... | 47 |
| 1.1 Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI)..... | 47 |
| 1.2 Inflamações e Infecções Crônicas..... | 49 |
| 1.3 Imunossupressão devido a transplantação | 50 |
| 2.Gamopatias Monoclonais Neoplásicas..... | 50 |
| 2.1 Discrasias Neoplásicas dos plasmócitos..... | 50 |
| 2.1.1.Mieloma Múltiplo Latente..... | 50 |
| 2.1.2 Mieloma Múltiplo | 51 |
| 2.1.3 Plasmocitoma..... | 53 |
| 3. Gamopatias Monoclonais por Deposição..... | 54 |
| 3.1 Amiloidose..... | 54 |
| 3.2 Deposição de cadeias leves..... | 56 |
| 3.3 Deposição de cadeias pesadas..... | 56 |
| 4 Linfomas e Leucemias..... | 57 |
| 4.1 Macroglobulinémia de Waldenström..... | 57 |
| 4.2 Leucemia Linfocítica Crônica..... | 57 |
| 4.3 Doença de Franklin..... | 58 |
| 4.4 Doença das cadeias pesadas mu..... | 58 |

| | |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 4.5 Doença das cadeias pesadas alfa..... | 59 |
| 4.6 Linfoma MALT (Mucosa Associated Linfoide Tissue)..... | 59 |
| Considerações Finais..... | 61 |
| Bibliografia..... | 62 |
| Anexo..... | 68 |

Índice de Figuras

Fig. 1.....13

Fig. 2.....15

Fig. 3.....18

Fig. 4.....19

Fig. 5.....20

Fig. 6.....24

Fig. 7.....27

Fig. 8.....28

Fig. 9.....28

Fig. 10.....29

Fig. 11.....31

Fig. 12.....34

Fig. 13.....42

Fig. 14.....44

Índice de Tabelas

Tabela1.....9

Tabela2.....10

Tabela3.....20

Lista de Abreviaturas

α -HCD- Alfa high chain disease

BCR-receptor de célula B IgM monomérico

EDTA-ácido etilenodiamino tetra-acético

ELP- Eletroforese de Proteínas

ELISA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GMSI-Gamopatas Monoclonais de Significado Indeterminado

K2 EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico

HLA-Human Leukocyte Antigens

LCD- Light Chain Disease

LLC-Leucemia Linfocítica Crônica

MALT- Mucosa Associated Linfoide Tissue

OMS – Organização Mundial de Saúde

VCAM-vascular cell adhesion molecule

WHO- World Health Organization

Introdução

Com o relatório de atividade profissional a autora tem o objetivo de obter o Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina através do programa especial “Para ser Mestre” a decorrer na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. É um programa estabelecido para Licenciados Pré-Bolonha, com pelo menos 5 anos de experiência profissional. Os Licenciados Pré-Bolonha devem apenas cumprir o estipulado na alínea b), do número 1, do artigo 20.o do Dec. Lei nº74/2006 de 24 de março para obter o referido grau académico.

O relatório está dividido em cinco partes principais. Na primeira parte do relatório dá a conhecer o percurso académico, e a experiência profissional como técnica superior num laboratório clínico, bem como trabalho realizado no posto de colheitas. Ainda descreve a composição organizacional dos locais onde trabalhou e estagiou.

Na parte II é descrita a fase pré-analítica do Laboratório Clínico e engloba a Flebotomia, e a atividade de Flebotomista, os aspetos a considerar antes da colheita de amostras biológicas, a triagem e a conservação de amostras biológicas. As colheitas de sangue para obtenção da amostra de soro usada na realização de testes laboratoriais que auxiliam no diagnóstico e no acompanhamento clínico de indivíduos com gamopatias.

A parte III deste relatório é dedicada à síntese de imunoglobulinas, características e estrutura, bem como às alterações a que as imunoglobulinas estão sujeitas e que as torna responsáveis pelas gamopatias.

Na parte IV são referidas as técnicas laboratoriais utilizadas no diagnóstico de gamopatias monoclonais com maior incidência na eletroforese de proteínas e na imunofixação.

Na parte V são apresentadas as principais gamopatias benignas e neoplásicas que beneficiam das técnicas laboratoriais descritas.

Parte I

Na presente secção é realizada uma breve descrição da experiência profissional da autora, bem como a caracterização organizacional do Laboratório Dr. Branco Lisboa e do Posto de Colheitas do Laboratório Dr. Joaquim Chaves. Estas instituições permitiram-lhe adquirir competências e conhecimentos desde as colheitas de produtos biológicos até à realização de diversas técnicas laboratoriais, como a eletroforese de proteínas séricas e imunofixação, utilizadas no diagnóstico laboratorial de Gamopatias Monoclonais.

1.Percurso Profissional

1.1 Estágio Profissional no Laboratório Dr. Branco Lisboa

No ano de 2000 realizou no Laboratório Branco Lisboa, em Caldas da Rainha um estágio profissional na profissão de Técnica Superior de Laboratório. Iniciou a prática de flebotomia sob a vigilância do Dr. João Branco Lisboa, especialista em Análises Clínicas da Ordem dos Farmacêuticos, realizando colheita de sangue venoso e de outras amostras biológicas para exames microbiológicos e micológicos.

No laboratório clínico, foi na área da Bioquímica que iniciou a sua experiência profissional em técnicas de eletroforese de proteínas séricas e em análises bioquímicas por métodos imunoenzimáticos e turbidimétricos, usando diferentes autoanalisadores.

1.2 Experiência Profissional no Laboratório Dr. Branco Lisboa

No final do ano 2000 ingressou nos quadros efetivos do Laboratório Branco Lisboa. Neste laboratório realizou diariamente colheitas de produtos biológicos. Trabalhou nas diferentes valências do laboratório utilizando equipamentos com metodologias próprias, para a realização de análises imunológicas, bioquímicas, eletroforese em folha de acetato, gel de agarose e por capilaridade, análises de coagulação, endocrinológicas, monitorização de fármacos, entre outras.

O avanço constante da tecnologia leva a que cada vez mais se utilizem equipamentos automatizados para a realização de análises clínicas, diminuindo assim o tempo de resposta na obtenção de resultados. No entanto, durante o percurso profissional no Laboratório Branco Lisboa utilizou técnicas manuais, quer na área de Microbiologia, quer na realização de Imunoeletroforese e Imunofixação.

A triagem e conservação dos produtos biológicos colhidos nos diferentes postos do laboratório e no próprio laboratório eram da sua responsabilidade.

A autora teve ainda um papel ativo na implementação e manutenção do sistema de gestão da qualidade e realizou diferentes tarefas desde participar ativamente, com a Direção da Qualidade, na redação da política da qualidade do Laboratório, do Manual da Qualidade de procedimentos técnicos. O controlo de qualidade interno, na área da Bioquímica e

Eletroforeses também eram de sua responsabilidade. O envio, cumprimento de prazos e interpretação dos resultados do controlo externo da qualidade, era também realizado por si, com o acompanhamento da Direção da Qualidade.

1.3 Experiência Profissional no posto de colheitas do Laboratório Dr. Joaquim Chaves, em Caldas da Rainha

Em 2018 o Laboratório Dr. Branco Lisboa foi vendido ao Laboratório Dr. Joaquim Chaves com sede em Miraflores. Numa fase inicial o laboratório ainda permaneceu em Caldas da Rainha realizando a mesma atividade como até então. Após alguns meses o laboratório foi deslocado para a sede, ficando apenas um posto de colheitas em Caldas da Rainha. No posto de colheitas de Caldas da Rainha realiza todo o tipo de colheitas de produtos biológicos e receciona também produtos de anatomia patológica e análises de águas. O acondicionamento e a estabilidade dos diferentes tipos de amostras e a sua preparação para transporte passou a ser também uma atividade diária no seu trabalho.

2. Composição Organizacional

2.1 Laboratório Clínico Dr. Branco Lisboa:

O laboratório clínico Dr. Branco Lisboa em Caldas da Rainha onde adquiriu experiência profissional possuía a seguinte organização:

- Direção Clínica
- Direção da Qualidade
- Setor da Bioquímica, Imunologia e Monitorização de Fármacos
- Setor da Endocrinologia
- Setor da Hematologia e Coagulação
- Setor da Microbiologia
- Setor da Urinálise
- Área de triagem e acondicionamento de amostras
- Área de colheitas e atendimento ao público

2.2 Posto de Colheitas do Laboratório Dr. Joaquim Chaves em Caldas da Rainha

O posto de colheitas apresenta a seguinte organização:

- Área de atendimento ao público
- Gabinetes para realização de colheitas

-Área de tratamento e acondicionamento de amostras para transporte.

Parte II

A principal razão que leva o clínico a prescrever um exame laboratorial ao seu paciente é para esclarecer dúvidas que o exame físico e o historial clínico não conseguem responder. Assim, um exame como as análises clínicas, tem como função auxiliar no diagnóstico clínico de enfermidades.

O laboratório clínico deve ter como missão esclarecer e fornecer uma ajuda eficaz ao clínico e ao paciente, e para isso é necessário que sejam desenvolvidas diversas ações com a mais elevada responsabilidade e correção técnica, para que o resultado final seja o mais verdadeiro e fidedigno. É preciso ter em consideração a existência de diversas variáveis biológicas, bem como a interferência de fatores não biológicos e que podem comprometer todo o processo até à obtenção de um resultado laboratorial (McCall & Tankersley, 1993).

Os testes laboratoriais são realizados respeitando uma sequência de atividades que cada laboratório organiza e realiza o mais correto possível, para transformar um determinado “input” (prescrição médica) num desejado “output” (relatório clínico) (Lima-Oliveira *et al*, 2017).

A atividade laboratorial está virtualmente dividida em três fases: a fase pré-analítica, a fase analítica e a fase pós-analítica. Estas fases estão de tal forma interligadas que quase não se podem separar (Lima-Oliveira *et al*, 2017).

A fase pré-analítica corresponde a uma sequência de ações que envolve diversos profissionais com diferentes formações, focos de interesse e grau de envolvimento. Esta fase é responsável pela maioria dos erros laboratoriais.

A autora, como interveniente na fase pré-analítica, certifica-se do cumprimento dos requisitos técnicos de colheita dos diversos produtos biológicos, com os riscos biológicos potenciais, com o acondicionamento, preservação e transporte das amostras. É sua responsabilidade alertar o laboratório se as análises são pedidas com carácter de urgência e assegurar a brevidade na obtenção dos resultados.

1. Flebotomia e a Atividade como Flebotomista

A principal amostra para análise em laboratório clínico é a amostra de sangue venoso colhido por venipunção (Lima-Oliveira *et al*, 2018).

A flebotomia (colheita de sangue) é uma prática muito antiga, remonta à época de Hipócrates (460-377 D.C.). As teorias defendidas por este físico descrevem o excesso de substâncias no organismo como o principal responsável pelo aparecimento de doenças.

Assim, para restaurar o equilíbrio do organismo eram realizadas sangrias, efetuadas com uma incisão numa veia e deixando o sangue correr livremente (McCall & Tankersley, 1993).

A palavra flebotomia tem origem grega, *phebos* quer dizer veia e *tome* incisão. Alguns autores consideram que esta técnica remonta a períodos mais antigos, desde a Idade da Pedra (McCall & Tankersley, 1993).

A flebotomia é um procedimento invasivo de importância vital para o desenvolvimento do processo analítico no laboratório e para a interpretação dos resultados para a obtenção de um diagnóstico, realizado pelo médico prescritor. O diagnóstico, o controlo do tratamento de doenças, a saúde de cada indivíduo e até mesmo o risco de vida podem ser comprometidos por um procedimento flebotomista sem qualidade (Lima-Oliveira *et al*, 2015).

A colheita de sangue tem sofrido alterações e os métodos e princípios têm melhorado drasticamente, continuando a ser uma prática comum nos nossos dias, apenas não é encarada como uma cura milagrosa. Atualmente, a principal utilização desta técnica é a obtenção de sangue por venipunção para realização de testes de diagnóstico (Lima-Oliveira *et al*, 2017). No entanto, a flebotomia como técnica terapêutica ainda é praticada em indivíduos com policitemia, excesso de produção de eritrócitos e em outros com distúrbios do sangue como a hemocromatose, excesso de ferro. A colheita de sangue venoso respeitando todos os procedimentos que permitem a obtenção de uma amostra com qualidade, para análise laboratorial são abordados neste relatório.

O profissional flebotomista tem a responsabilidade de colher sangue para a realização de análises laboratoriais, que vão auxiliar no diagnóstico e tratamento dos indivíduos.

De acordo com Lima-Oliveira *et al* (2017), para obter os melhores e mais fiáveis resultados laboratoriais devem ser cumpridos requisitos como colher sangue venoso de acordo com as análises prescritas, confirmar que os indivíduos se encontram de acordo com requisitos necessários para a realização das colheitas. O profissional deve identificar corretamente as amostras e prepará-las para transporte, caso se justifique, assegurando a sua estabilidade.

A relação de empatia entre os intervenientes facilita a obtenção e o registo toda a informação relevante (idade, sexo, dieta, stress, prática de exercício físico, gravidez, terapêutica), que é essencial para a interpretação dos resultados obtidos na fase pós-analítica.

2. Aspetos a considerar antes da colheita de Amostras Biológicas

2.1 Preparação do indivíduo

A preparação do indivíduo pode variar, consoante o tipo de análise a realizar e é da maior importância. Existem alguns requisitos gerais que devem ser cumpridos para diminuir o erro inerente a este processo.

As fases que fazem parte do processo analítico são passíveis de erro e estes erros têm um efeito aditivo contribuindo para um resultado cada vez mais errôneo. Para minimizar a variabilidade pré-analítica é necessária a normalização da preparação do indivíduo e sem esta preocupação não será possível a comparação de resultados analíticos com resultados obtidos anteriormente, o que põe em causa a decisão médica e um futuro diagnóstico (Simundic *et al*, 2013).

O estado de jejum é uma das variáveis pré-analíticas com efeitos potenciais nos resultados analíticos. A colheita de sangue deve ser realizada preferencialmente durante o período da manhã, das 7h às 9h, com um jejum de 12 horas, durante o qual o consumo de água é permitido (Simundic *et al*, 2013).

De acordo com Simundic *et al* (2013) as bebidas alcoólicas devem ser evitadas nas 24h que antecedem a colheita de sangue e os indivíduos não devem fumar, tomar café ou chá, uma vez que no caso do tabaco, a taxa metabólica das lipoproteínas aumenta consideravelmente 1h após fumar um único cigarro. A cafeína ingerida em jejum provoca um aumento da glicose em jejum.

A atividade física deve ser evitada nas 72 horas que antecedem a colheita quando são requeridas análises como a desidrogenase láctica ou creatina-fosfoquinase, devido ao esforço físico, uma vez que são marcadores musculares.

No caso de não existir recomendação médica, a medicação deve ser efetuada apenas após a colheita de sangue (Lima-oliveira *et al*, 2017).

A administração de contraste radiológico ocorrido aquando da realização de tomografia axial computadorizada (TAC) ou ressonância magnética provoca alterações em alguns tipos de análises, como na função tiroidea, pelo que é recomendado ao paciente que aguarde 5 a 15 dias após a sua administração.

A normalização de requisitos para a obtenção de amostras com qualidade deve ser implementada por todos os laboratórios e é da responsabilidade dos profissionais de saúde, que desempenham funções de flebotomia, divulgar toda a informação necessária para o seu cumprimento (Simundic *et al*, 2013).

2.2 Fatores que influenciam o estado basal do paciente

Um indivíduo é considerado em estado basal pela manhã, enquanto o organismo ainda está relaxado e em jejum. No laboratório os valores de referência para os diferentes parâmetros em análise são estabelecidos com base em amostras colhidas nestas condições (McCall & Tankersley, 1993).

O profissional flebotomista tem em consideração diariamente fatores que podem provocar alterações nos resultados das análises.

A idade dos indivíduos é importante porque os valores de alguns componentes do sangue como os eritrócitos e os leucócitos são mais elevados em recém nascidos que em adultos. O sexo do utente, pois os valores de análises de hemoglobina são diferentes entre

homens e mulheres. A diminuição de fluidos no organismo provocada por episódios de diarreia ou vômitos, provoca hemoconcentração, levando à determinação errônea de contagens de eritrócitos, enzimas, ferro, cálcio e sódio, pelo que deve ser mencionado ao técnico de colheita (Andrilo *et al*, 2010).

Existem parâmetros como o cortisol que apresenta valores mais elevados durante a manhã e diminui ao longo do dia, pelo que a colheita deve acontecer até às 10 horas da manhã no máximo (Andrilo *et al*, 2010).

O efeito dos medicamentos está relacionado com alterações nas funções fisiológicas do organismo. É necessário monitorizar estes indivíduos para controlar as funções fisiológicas e metabólicas e é essencial conhecer o tipo de medicação que o indivíduo toma. As análises como creatinina, proteínas séricas, e algumas enzimas marcadores musculares aumentam após atividade física intensa (Lima-Oliveira *et al*, 2017).

A gravidez é um fator que deve ser tido em conta, uma mulher grávida pode apresentar valores de eritrócitos mais baixos (Andrilo *et al*, 2010).

A mudança de posição de supina para sentada provoca movimentação do líquido intersticial e das substâncias filtráveis do espaço intravascular para o intersticial, ou seja verifica-se hemodiluição ou hemoconcentração. As substâncias com elevado peso molecular terão uma concentração mais elevada, até que o equilíbrio hídrico se restabeleça. Por exemplo, os valores de albumina, proteínas totais, colesterol, triglicéridos, hematócrito e hemoglobina podem apresentar uma concentração superior se a colheita for realizada na posição ereta (McCall & Tankersley, 1993).

Lippi *et al* (2015), concluíram que a posição em que ocorre a colheita de sangue deve ser normalizada (sempre sentada ou sempre em posição de supina). As indicações e informações que são referidas aos pacientes devem ser uniformes, para uma posição de referência. Independentemente da posição selecionada, os pacientes devem repousar durante alguns minutos nessa posição, antes da colheita de sangue venoso para que não haja alteração na concentração de alguns analitos. Neste estudo verificaram também que as maiores variações no volume do plasma se observavam quando a colheita se realizava na posição ereta, pelo que não é a posição mais recomendada.

2.3 Colheita de Sangue por Punção Venosa

A colheita de sangue venoso é um processo que carece de material específico, esterilizado e descartável próprio para esse fim, como agulhas e seringas ou sistema de vácuo, tubos de colheita de sangue, garrote, algodão, pensos.

O material usado para punção venosa apresenta características técnicas próprias, específicas para determinado uso. As agulhas, podem ser adquiridas de diversos fornecedores, e são usadas em sistemas de vácuo ou para conectar com seringa. Este material pode ser classificado em dois sistemas diferentes, aberto (seringa e agulha) e fechado (vácuo) (Lima- Oliveira *et al*, 2017).

A “butterfly” consiste numa agulha com um pequeno tubo que conecta à seringa ou pode ser adaptada ao aplicador do sistema de vácuo sendo usada no sistema aberto e no fechado.

As agulhas estão normalizadas por diâmetro (G), ou seja quanto maior o número gauge (G) menor o diâmetro da agulha. Na colheita de sangue venoso as agulhas podem variar de 19 a 25 G. As agulhas de 19-21 G são usadas para punção em veia antecubital larga. As agulhas de 23 G são usadas para veias antecubitais mais pequenas, veias das mãos ou pés, e por fim as agulhas 25 G são mais utilizadas em recém nascidos ou em crianças com veias muito finas (Lima-Oliveira *et al*, 2017).

Lima-Oliveira *et al* (2012), refere que os laboratórios clínicos devem preferir o sistema de tubos com vácuo e não a utilização de seringa e agulha na realização das punções venosas, de uma forma geral, uma vez que nestes tubos a mistura entre o sangue colhido e os aditivos como anticoagulantes e ativadores do coágulo, é mais eficiente. No entanto, o laboratório clínico deve testar e realizar procedimentos de verificação antes de adotar um determinado sistema de tubos de vácuo. Existem muitos sistemas de vácuo no mercado e que podem trazer diferenças nos resultados finais, pelo que o laboratório deve assegurar que a escolha é a mais apropriada para a sua realidade.

Como já foi mencionado anteriormente e tem sido reportado por diversos investigadores, a maioria dos erros ocorre na fase pré-analítica, cerca de 46% a 68.2%, uma área que geralmente está fora do controlo direto do laboratório (Cornes *et al*, 2017).

As diretrizes nacionais e internacionais remetem para uma ordem de tubos pela qual deve ser efetuada a colheita de sangue (Al-Abdulrazzak *et al*, 2017).

A ordem de tubos que deve ser respeitada pelo flebotomista indica que primeiro, deve ser colhido sangue para frasco de cultura, em segundo lugar deve colher o tubo com citrato, como aditivo, para análises de coagulação. Em terceiro lugar o tubo de soro com ou sem gel, seguido de tubo de soro isento de metais, depois o tubo com heparina de lítio. Segue-se o tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), para análises de hematologia e por fim o tubo com EDTA-gel (Cornes *et al*, 2017).

Na colheita de sangue nem sempre é necessário colher todos estes tubos, depende da prescrição médica. No entanto, é importante obedecer sempre a esta ordem para não aumentar o erro na fase pré-analítica.

Cornes *et al*, (2017) vem reforçar que as diretrizes da Organização Mundial de Saúde são de elevada importância e devem ser seguidas as recomendações para a ordem de tubos a colher pelo flebotomista, pois independentemente do sistema utilizado, seja seringa e agulha ou sistema de vácuo, existe uma percentagem significativa de contaminação das amostras se a ordem de tubos não for respeitada.

Um dos anticoagulantes mais comuns é o EDTA K2 (ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico), que é usado em tubos para a contagem de células sanguíneas (hemograma, leucograma e plaquetas) e diagnósticos moleculares, podendo ainda ser utilizado na determinação de ácido fólico eritrocitário, hemoglobina glicada, monitorização de

imunossupressores, como tacrolimus, e o grupo de sangue. O citrato de sódio é usado para estudos da coagulação como o tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial, fibrinogênio e D-Dímeros. A heparina é outro anticoagulante usado numa variedade de testes. Os tubos podem conter heparina de sódio ou heparina de lítio. Em geral, a heparina de lítio é usada para testes químicos no entanto, nunca deve ser usada na determinação do analito lítio. A heparina sódica é usada quando é necessário obter linfócitos funcionais viáveis, como nos casos do HLA (Human Leukocyte Antigens) e nunca deve ser usada na determinação do sódio no sangue. Um tubo de heparina de lítio não deve ser usado quando a recomendação é a utilização de um tubo de heparina de sódio. A diferença entre estes tubos é mencionada no rótulo. O fluoreto de oxalato foi o mais usado em provas de glicemia e determinação de álcool no sangue. As enzimas que alteram a concentração de glucose e de álcool no sangue são inibidas pelo fluoreto e a coagulação é impedida pelo oxalato (Bayot & Tadi, 2020).

Tabela 1 – Anticoagulantes ou aditivos utilizados nos tubos de colheita de sangue (Dias, 2017).

| Cor da tampa | Aditivo | Testes aplicáveis |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
|  Vermelho | Sem aditivo | Bioquímica e Imunologia |
|  Amarelo | Ativador de coágulo com gel | Bioquímica e Imunologia |
|  Laranja | Coagulante | Bioquímica e Imunologia |
|  Azul | Citrato de sódio 1,9% | Mecanismos de coagulação |
|  Cinza | Fluoreto de sódio e oxalato de potássio Fluoreto de sódio e heparina sódica | Glicose e tolerância a glicose |
|  Verde | Sódio heparina Lítio heparina | Bioquímica em plasma |
|  Roxo | EDTA dissódico | Hematologia clínica |
|  Preto | Citrato de sódio 1,4% | Taxa de hemossedimentação |
|  Branco | EDTA dissódico Ativador de coágulo com gel | Monitoração quantitativa de rastreamento HIV e Rastreamento Clínico do Sangue |

Aos tubos de colheita está associado um código de cores como é possível observar na Tabela 1. O código de cores pode diferir ligeiramente de fabricante para fabricante, e identifica o tipo de anticoagulante ou aditivo que o tubo possui ou não, tornando a sua identificação mais fácil (Bayot & Tadi, 2020)

Assim, para alguns exames como análises bioquímicas o tubo mais utilizado é o tubo de soro com partículas ativadoras do coágulo, de tampa vermelha ou amarela; para análises de coagulação utiliza tubos de tampa azul, com aditivo de citrato de sódio, se a análise em

questão for um hemograma então a colheita de sangue é realizada para um tubo de EDTA K2 de tampa roxa como é possível observar na Tabela1 (Dias, 2017).

O agitar dos tubos de colheita deve ser realizado por inversão de 180°, para homogeneização das amostras e o número de inversões recomendadas para cada tubo, varia de acordo com o fornecedor como é possível observar na tabela 2.

Tabela 2– Número de inversões recomendadas por três fornecedores diferentes, para cada tipo de tubo (Adaptado de Lima-Oliveira, *et al*, 2009).

| Descrição do aditivo | Bechan Dickinson | Greiner bio-one | Sarstedt |
|--------------------------------|------------------|-----------------|----------|
| Tubo sem aditivo | Não é necessária | 5 a 8 vezes | 10 vezes |
| Tubo com citrato de sódio | 5 a 8 vezes | 5 a 8 vezes | 10 vezes |
| Tubo com gel separador | 5 a 8 vezes | 5 a 8 vezes | 10 vezes |
| Tubo com heparina | 8 a 10 vezes | 5 a 8 vezes | 10 vezes |
| Tubo com EDTA | 8 a 10 vezes | 5 a 8 vezes | 10 vezes |
| Tubo com inibidor da glicolise | 8 a 10 vezes | 5 a 8 vezes | 10 vezes |

A escolha dos fornecedores é da responsabilidade da direção técnica de cada laboratório. Quando o laboratório realiza uma alteração no material de colheita, como uma mudança de fornecedor dos tubos de colheita, é necessário testar e avaliar os diferentes tubos de vácuo existentes no mercado, realizando testes e comparando a variação nos resultados obtidos para tubos de diferentes fornecedores.

Lima-Oliveira *et al* (2012) realizou uma avaliação a cinco tubos de vácuo de diferentes fornecedores, para análises bioquímica de rotina, e constatou que estavam validados para 83,3% dos analitos bioquímicos no entanto, 16,7% dos testes efetuados não obtiveram validação. A concentração do gel separador do coágulo bem como a composição deste gel são patenteadas, um “segredo industrial”, que não ajuda a clarificar as causas das variações encontradas. A direção clínica do laboratório deve avaliar a qualidade dos seus materiais de colheita, quer os tubos de vácuo, quer o restante material que utiliza no processamento das análises .

A qualidade do material usado na colheita de sangue é muito importante para o flebotomista pois permite trabalhar com maior segurança em situações que nem sempre são as mais fáceis com veias que nem sempre são fáceis de puncionar.

A colheita de sangue venoso deve obedecer à sequência de acontecimentos recomendados pelas diretrizes para colheita de sangue da Organização Mundial de Saúde e que a autora segue na sua prática diária. A autora, como flebotomista, interpreta e verifica a solicitação médica, certifica-se de que o indivíduo está em condições para realizar a colheita. Questiona o indivíduo sobre o tempo de jejum e a medicação que realiza diariamente, factos importante para a interpretação de resultados algo anómalos.

Um código de barras é emitido e contém o número que foi atribuído aquando da admissão na receção e permite rastrear todo o processo analítico. Com este código de barras marca os tubos que irá utilizar na colheita de sangue.

O torniquete deve ser aplicado 7.5 a 10 cm acima do local da punção, e não deve apertar mais que 1 minuto, sendo o ideal 30 segundos (Lima-Oliveira *et al*, 2015). A estenose provocada pelo torniquete reduz o fluxo sanguíneo e é responsável pelo efluxo de água do vaso sanguíneo para o espaço intersticial. Os elementos com baixo peso molecular difundem-se com a água enquanto que os compostos com elevado peso molecular e as células ficam concentrados na veia.

Foi demonstrado por Lima-Oliveira *et al* (2015) o impacto que a estenose provocada pela aplicação do torniquete tem em análises de rotina. No estudo realizado, a partir dos 60 segundos analitos como glucose, proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, triglicéridos, potássio, cálcio, magnésio entre outros, sofrem um aumento significativo.

O local de punção deve ser devidamente desinfetado, prevenindo infeções por microrganismos existentes na pele, deve aguardar que o desinfetante seque antes de realizar a punção. A desinfecção deve ser realizada após a aplicação do torniquete e antes da punção (Lima-Oliveira *et al*, 2017).

As veias do braço são preferenciais, na região da fossa ante cubital, podendo recorrer às veias localizadas no dorso da mão, quando as primeiras não estão disponíveis ou são inacessíveis (Andrilo *et al*, 2010).

De acordo com Lima-Oliveira *et al* (2015), na prática diária mais de 78 % das colheitas de sangue periférico é realizada na veia cubital mediana, e baseada na distribuição cutânea das veias e nervos, a veia cubital mediana corresponde ao local de menor risco em toda a região cubital.

A colheita de sangue é realizada com a punção na veia selecionada e os tubos colhidos na sequência correta, de acordo com as análises solicitadas. De seguida, realiza-se a homogeneização dos tubos por inversão, de acordo com as orientações do fornecedor. A inversão dos tubos colhidos com o sistema de vácuo, mesmo que seja vigorosa de acordo com Lima-Oliveira *et al*, (2012) não vem introduzir um fator de erro no resultado laboratorial. Os tubos colhidos devem ser colocados num suporte na posição vertical.

Ao indivíduo é colocado um penso rápido no local da punção e é recomendado não dobrar o braço, não carregar pesos com o braço onde foi realizada a punção, para evitar complicações como o surgimento de hematomas (Al-Abdulrazzak *et al*, 2017).

3. Triagem de Produtos Biológicos

3.1 Preparação das Amostras Colhidas

As amostras colhidas nas instalações do laboratório e nos postos de colheitas são rececionadas no interior do laboratório, numa área destinada à triagem, preparação e

armazenamento de amostras. Neste local é realizada uma primeira abordagem às amostras, sendo separadas por tipo de produto, sangue, urina ou exsudados, de seguida, por tipo de tubo colhido (tubos de soro, tubos de hemograma, tubos de citrato, tubos de heparina, etc.) e tipos de urina (urina tipo II, urina assética, urina de 12h, urina de 24h).

Os tubos de soro depois de colhidos devem permanecer à temperatura ambiente durante 1 hora antes de serem centrifugados. O tempo de espera está dependente da ação do pro-coagulante aditivo existente nos tubos. Os tubos com aditivo citratado, ou heparina são centrifugados sem ser necessário aguardar qualquer tempo de espera, para obter a separação entre plasma e elementos figurados do sangue (Lima-Oliveira *et al*, 2018).

A centrifugação dos tubos de colheita é um passo crítico, uma vez que uma centrifugação incorreta pode prejudicar a integridade da amostra. A força de centrifugação (*g*-force) nem sempre é mencionada como uma fonte de variação no processo pré-analítico no entanto, o laboratório deve definir qual a força relativa de centrifugação a utilizar, bem como o tempo de centrifugação necessário, tendo em atenção as recomendações do fabricante dos tubos de colheita (Monneret *et al*, 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, tubos com anticoagulantes devem ser centrifugados a 2000-3000*g* durante 15 minutos e os tubos de soro durante 10 minutos a 1500*g* (Al-Abdulrazzak *et al*, 2017) .

A centrifugação dos tubos ocorre muitas vezes nos postos de colheita, ainda fora das instalações do laboratório, uma vez que estes locais nem sempre são muito próximos do laboratório central.

Os estudos realizados por Friedel & Mattenheimer (1970), referiam que os tubos de soro que aguardam durante um período superior a 2 horas para centrifugação podem apresentar concentrações mais elevadas de alguns analitos, porque existe difusão dos analitos presentes no interior de eritrócitos, leucócitos ou plaquetas para o soro, falseando assim a sua concentração.

Os tubos de soro são observados tendo atenção para a presença de hemólise, existência de tubos de soro visivelmente lipémicos, se têm quantidade suficiente de amostra e se respeitam a proporção aditivo/sangue. Os códigos de barras que identificam os tubos devem estar intactos, caso seja necessário são tirados novos códigos de barras para substituir os que estão sujos ou rasgados e se a amostra for francamente insuficiente é pedida uma repetição de colheita.

Enquanto os tubos de soro e com aditivo (citrato/EDTA-k2/heparina) estão em centrifugação, inicia-se o processo de triagem dos tubos de hemograma, urinas tipo II, urina assética, zaragatoas com exsudados, entre outros no sistema informático do laboratório. É com a utilização de interfases informáticos como o Process System Management (PSM) que os produtos biológicos de cada indivíduo ficam registados no sistema informático do laboratório, sendo possível a sua rastreabilidade, bem como a criação de listas de trabalho em cada área do laboratório.

3.1.1 Obtenção da Amostra de Soro

A amostra mais utilizada na realização da maioria das análises bioquímicas e imunológicas, entre as quais se encontra a eletroforese de proteínas e a imunofixação é o soro. A colheita de sangue para obtenção de soro é realizada em tubos secos ou com aditivo que favorece a coagulação, ou com gel separador.

O soro é definido como a parte líquida do sangue obtido após o processo de formação do coágulo e posterior centrifugação. A sua aparência nos tubos de colheita é de um líquido de coloração amarelada, normalmente límpida separado por um gel, de um coágulo de células e fibrina que se deposita no fundo do tubo (Lima-Oliveira *et al*, 2018).

A principal diferença entre o soro e o plasma é que uma amostra de plasma é obtida sem que haja a formação de um coágulo, ou seja sem que se utilizem as proteínas de coagulação, uma vez que este processo é travado pelo anticoagulante presente no tubo de colheita e a sua centrifugação pode ser imediata (Lima-Oliveira *et al*, 2018).

Rosenberg-Hasson *et al*, (2014) refere que a amostra de soro tem na sua composição água, albumina, globulinas, lipoproteínas, aminoácidos, enzimas, hormonas, compostos nitrogenados, vários iões e outras substâncias como, as citocinas. O plasma possui a mesma constituição do soro, mas com o fibrinogénio e as proteínas de coagulação. Ainda apresenta ligeiras diferenças nas concentrações dos iões e possui uma densidade ligeiramente superior à da densidade da amostra de soro.

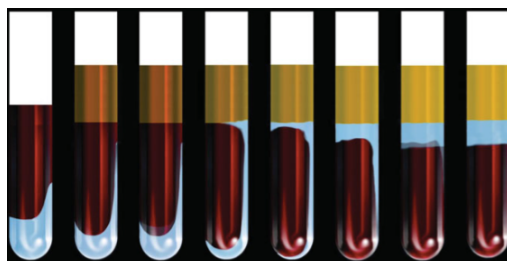


Fig.1– Processo de centrifugação com movimentação do gel separador (na imagem com coloração azul claro), devido à força de centrifugação e à diferença de densidade entre soro (1.024g/mL), gel separador (de 1.040 a 1.050g/mL) e coágulo (1.092 a 1.095g/mL) (Adaptado de Lima-Oliveira *et al*, 2018).

Na Fig.1 é possível observar como o sangue colhido para um tubo com gel separador e após formar coágulo composto por proteínas entrelaçadas, sofre uma movimentação quando é centrifugado. O coágulo desce para a parte inferior do tubo e o soro fica na parte superior do tubo de colheita, separados pelo gel. É a diferença de densidade e a força de centrifugação que permitem esta movimentação.

Uma outra amostra muito utilizado em eletroforese é a urina. É uma amostra de fácil obtenção, sendo preferível uma urina de 24 horas quando se proceder a eletroforese de proteínas urinárias, imunofixação ou para dosear cadeias leves livres (Harris & Winter, 2012).

3.2 Triagem de amostras biológicas usando o Process System Management (PSM)

O Process System Management (PSM) é um interface que permite a separação e distribuição dos produtos biológicos pelas diferentes áreas do laboratório, e também permite registar a chegada das amostras, na ficha de cada indivíduo. A autora utilizou este sistema no seu trabalho diário.

O PSM é constituído por um computador, com leitor de código de barras e com uma impressora de códigos de barras associado. Quando o código de um produto biológico é introduzido no PSM, quer pelo leitor de códigos de barras quer manualmente, por inscrição do código, o equipamento reconhece a que área de trabalho pertence o produto e dá a indicação ao técnico para onde se destina. Por exemplo, ao passar um código de um tubo de soro, o equipamento distribui consoante as análises registadas. Se as análises prescritas forem eletroforese de proteínas e imunofixação e doseamento de imunoglobulinas, o equipamento imprime um conjunto de etiquetas que permitem a separação do soro do tubo primário (tubo de colheita para soro) único, em várias alíquotas, consoante as análises. A criação de alíquotas permite melhorar o fluxo de trabalho do laboratório, tornando-se mais rápido. Desta forma, cada área recebe uma amostra para trabalhar sem que tenha que aguardar pelo tubo primário.

No laboratório onde trabalhou, por opção da Direção Técnica, o tubo de soro primário apenas era usado na área da Bioquímica, sendo depois arquivado em sero teca durante 7 dias a 2° a 8°C. As alíquotas produzidas depois de utilizadas pelas diferentes áreas são descartadas.

No final de cada manhã e após triar todas as amostras colhidos e entregues nesse dia, é possível verificar quais as amostras em falta e confirmar as amostras que deram entrada nesse dia.

As faltas de amostra devem coincidir com as faltas registadas pelos técnicos flebotomistas que realizam as colheitas. Quando tal não se verifica é necessário contactar com o técnico de colheita ou por vezes com o próprio indivíduo.

A triagem de produtos biológicos num laboratório de análises clínicas é um processo da fase pré-analítica que requer muita atenção e cuidado, uma vez que podem ocorrer erros que interferem nos resultados clínicos.

As amostra de plasma e soro, com ou sem gel separador podem sofrer alterações com o decorrer do tempo, até a chegada ao laboratório, pelo que a sua conservação e transporte são fatores determinantes para a obtenção de resultados fiáveis.

De acordo com O'Keane & Cunningham (2006), existe uma falta de consenso quanto a qual o melhor tipo de amostra a escolher para a realização das análises bioquímicas, sendo o soro obtido através da coagulação do sangue, a amostra de eleição para muitos laboratórios. Foi realizado, por estes autores, um estudo em que analitos bioquímicos de rotina foram testados usando diferentes tipos de amostras obtidas de tubos de soro sem gel

separador, plasma e de tubos de soro com gel separador. Os resultados permitiram concluir que o soro obtido de tubos com gel separador apresenta vantagens em relação ao soro obtido sem gel separador e em relação ao plasma. Quando os analitos foram determinados com apenas 2 horas decorridas após a colheita, as diferenças entre os valores obtidos não foi muito significativa, com exceção do potássio. Os tubos com gel separador apresentam um aumento da estabilidade de analitos como o potássio, a ureia e a creatinina, quando comparados com os tubos com plasma e no caso do potássio e da creatinina quando comparados com tubo de soro sem gel separador, à temperatura ambiente. Os autores concluíram que o tubo de soro com gel separador apresenta vantagens para os analitos bioquímicos de rotina e também maior proteção contra contaminações uma vez que não é necessária a aliquotagem, com exceção do analito fenitoína que requer aliquotagem para posterior análise, devido à sua instabilidade.

Foi demonstrado por Cuhadar *et al*, (2012) que os analitos bioquímicos determinados em tubos de soro com gel separador não apresentam diferenças significativas à temperatura ambiente durante cerca de 3 dias, mas é importante referir que em locais em que a temperatura ambiente é superior a 21°C é necessário recorrer a refrigeração com intervalo de 4°C a 8 °C, o que permite uma estabilidade de 7 dias. A congelação de amostras de soro a cerca de -21°C pode proteger a qualidade da amostra até 1 mês, mas tudo detende do analito em questão.

A quantidade e qualidade da amostra têm que ser uma preocupação constante, uma vez que pequenas quantidades de amostra podem originar resultados incorretos, bem como amostras mal conservadas (Grankvist *et al*, 2018).

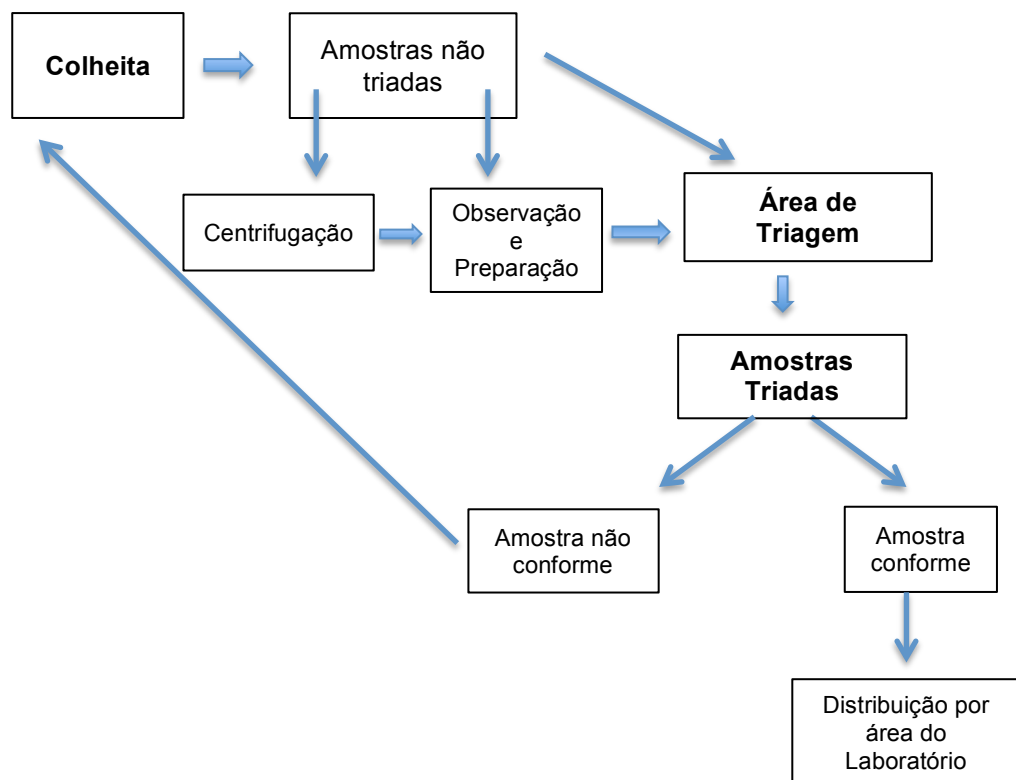


Fig.2- Exemplo do processo de triagem no Laboratório Clínico

Na Fig.2 é possível observar a dinâmica que existe diariamente no sector da triagem de um laboratório. Uma amostra conforme é fundamental para a obtenção de um resultado fiável. Quando este facto não se verifica, quer por uma amostra visivelmente hemolisada ou de pouca quantidade devido a uma má prática de colheita, ou lipémica, devido à falha no cumprimento da preparação por parte do indivíduo, é necessário ter a coragem de pedir uma nova amostra. Este facto é por vezes difícil de explicar a um indivíduo sem conhecimento de causa.

Parte III

1. Resposta imunitária responsável pela síntese de Imunoglobulinas

O sistema imunitário participa na manutenção da Homeostasia do organismo através de interações celulares e moleculares complexas. O conhecimento destas interações permite uma atuação clínica mais segura e uma melhor identificação de padrões fisiopatológicos associados a perturbações no equilíbrio indivíduo. O organismo reage a infeções, tumores e transplantes e é importante conhecer a forma de funcionamento do sistema imunitário, as suas células e os processos de ativação. Mas, mais concretamente dos linfócitos B, produtores de imunoglobulinas cujas alterações são responsáveis pelo aparecimento de gamopatias. Os diferentes componentes do sistema imunitário são ativados em cada situação, contribuindo muitas vezes para os sinais e sintomas observados pelo indivíduo (Barbuto *et al*, 2014).

As principais células da resposta imune adaptativa são os linfócitos B, T e células NK. Os linfócitos são células de 6 a 15 μm de diâmetro e que têm origem na medula óssea. No sangue periférico circulam em número variável e representam 35% dos leucócitos (Barbuto *et al*, 2014).

Na medula óssea o precursor linfoide sofre diferenciação passando a células precursoras pró-linfócito B, pró-linfócito T e pró-NK. Esta diferenciação não apresenta alterações em etapas morfológicamente muito diferentes. Os diferentes tipos celulares só se diferenciam após a apresentação do antígeno específico. Quando esta etapa acontece ocorre ativação linfocitária com mudanças morfológicas e bioquímicas e o linfócito transforma-se em linfoblasto ativado e posteriormente em plasmócito para síntese de imunoglobulinas ou em linfócito T citotóxico (Soane, 2002).

Os linfócitos B apresentam uma ligação direta entre o local de recetor do antígeno e o próprio antígeno, o que não acontece nos linfócitos T. É esta ligação que permite a produção de anticorpos ou imunoglobulinas. Após a ligação ao recetor do antígeno é ativada, como referido, a produção de diferentes classes que possuem maior afinidade pelo antígeno. Este processo é denominado maturação do anticorpo (Barbuto *et al*, 2014).

As moléculas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos, nos linfócitos B são as imunoglobulinas de membrana, IgM e IgD. Estas são a contrapartida dos recetores de linfócitos T (TCR) e por analogia são denominadas recetores de linfócitos B (BCR) em alguns contextos.

1.1 Maturação dos Linfócitos B

O desenvolvimento das células do plasma inicia-se com a hematopoiese no microambiente da medula óssea, por influência de uma tirosina kinase (FLT3), moléculas de adesão (CAM e VLA-4/VCAM-1), interleucina -17(IL-7), formando-se uma célula pró-linfócito B imatura. A célula pró-linfócito B imatura sofre uma recombinação do segmento do gene D para o segmento do gene J, na cadeia pesada do gene da imunoglobulina (IgH), no cromossoma 14. A recombinação dos segmentos D para J (DJ) acontece nesta fase inicial do pró-linfócito B. Quando o pró-linfócito B está maturo a IL-7 continua a estimulação e ocorre a recombinação do segmento V do gene para o segmento DJ, formando a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina. A expressão da cadeia pesada μ , juntamente com a cadeia leve δ origina a expressão da superfície da pré célula-B recetora e a identificação da maioria das pré células-B. A cadeia leve é emparelhada com a cadeia pesada. Após a recombinação da cadeia leve se expressar, juntamente com a cadeia pesada μ , o recetor de célula B IgM monómero (BCR) é expresso na superfície das células B. Esta célula é determinada uma célula B imatura. Se esta célula experimentar uma estimulação significativa por contacto entre o seu BCR e um antígeno, o linfócito B imaturo pode desencadear o processo de apoptose ou pode tornar-se anérgica, isto é, a célula está viva mas não reage (Harris & Winter, 2012).

Através da expressão do RNA mensageiro, pela transcrição do segmento génico constante δ , do segmento génico constante μ e a variabilidade obtida pela recombinação, o linfócito B maturo vai expressar na sua superfície a IgD e a IgM.

Quando o linfócito B maturo contacta com o antígeno através do seu BCR e recebe informação CD4 das células T, a célula B matura sofre alterações, prolifera para expressar IgG, IgA ou IgE, em vez de IgM ou IgD. Pode ainda evoluir para uma célula do plasma ou uma célula B de memória (Harris & Winter, 2012).

Na fig.3 é possível observar todo o processo de maturação dos linfócitos B.

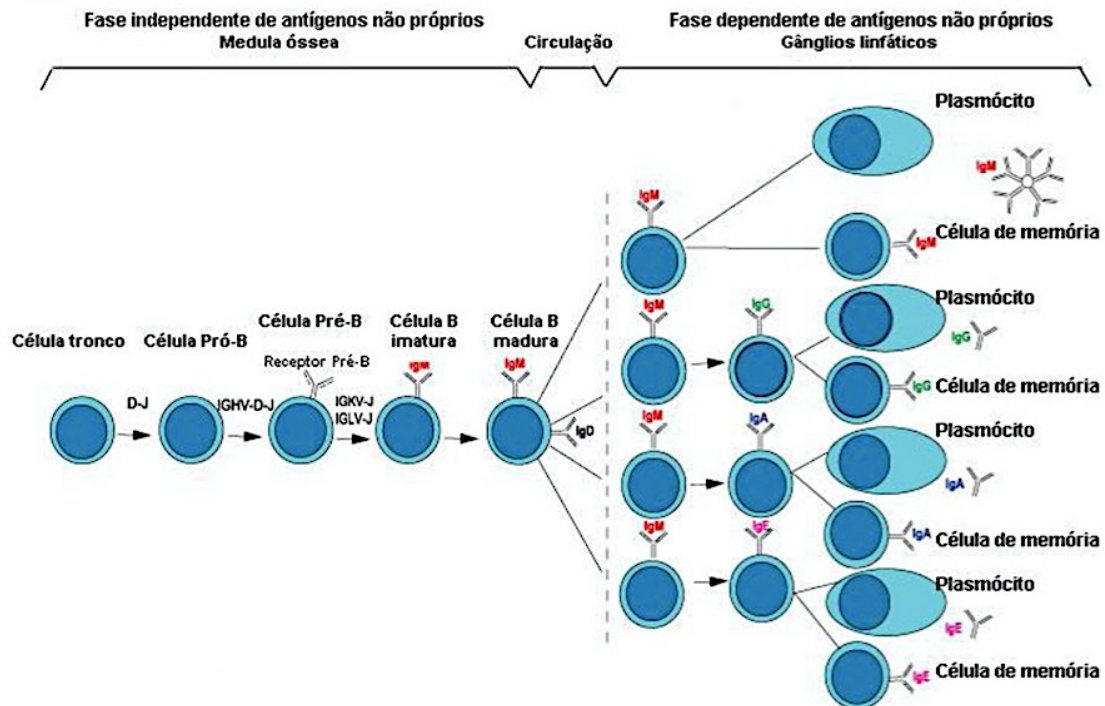


Fig. 3 – Maturação dos linfócitos B e síntese de imunoglobulinas (Adaptado de Arantes, 2018).

2. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas constituem um grupo de glicoproteínas presentes no soro e fluidos teciduais de todos os mamíferos. Algumas estão situadas na membrana dos linfócitos B e funcionam como receptores para antígenos, enquanto que outras estão livres no soro ou na linfa. Ao contrário de outras proteínas plasmáticas as imunoglobulinas não são sintetizadas no fígado, mas sim nas células do sistema imunitário, os linfócitos B. Em média têm um período de atividade de 6 a 21 dias, dependendo do tipo de gamaglobulina (Harris & Winter, 2012).

As imunoglobulinas são sinónimo de anticorpos, uma vez são a “arma de ataque” do sistema imunitário. Estas ligam-se a antígenos da superfície celular e desencadeiam um conjunto de eventos que incluem a ativação de proteínas do complemento, que desencadeia a destruição ou a fagocitose de células alvo; a opsonização de células bacterianas, anticorpos ligam-se à parede de células bacterianas e potencia a fagocitose destas células alvo; inativação de toxinas bacterianas ou partículas virais; a formação de um complexo imune com a deposição de combinados anticorpo-antígeno (Harris & Winter, 2012).

Cada cadeia de imunoglobulina é formada a partir de segmentos génicos que se rearranjam numa sequência específica para originar a cadeia completa. A porção variável da cadeia pesada das imunoglobulinas é codificada pelos segmentos VH, DH e JH. Há mais de 50 genes VH, ~25 DH e 6 JH dispostos sequencialmente no cromossoma, seguidos das regiões constantes Cμ, Cδ, Cγ3, Cγ1, Cα1, Cγ4, Cγ2, Cε1 e Cα2. Nas cadeias leves os

segmentos são: ~35 V κ , 5 J κ e um só segmento C κ ; ~30 V λ e 4 conjuntos J λ C λ (Harris & Winter, 2012)

2.1 Estrutura e Classes de Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são proteínas solúveis libertadas pelos linfócitos B ativados. A estrutura das imunoglobulinas compreende um domínio variável e um domínio constante. Conhecer a sua estrutura vai permitir compreender melhor como estas imunoglobulinas se comportam na eletroforese de proteínas.

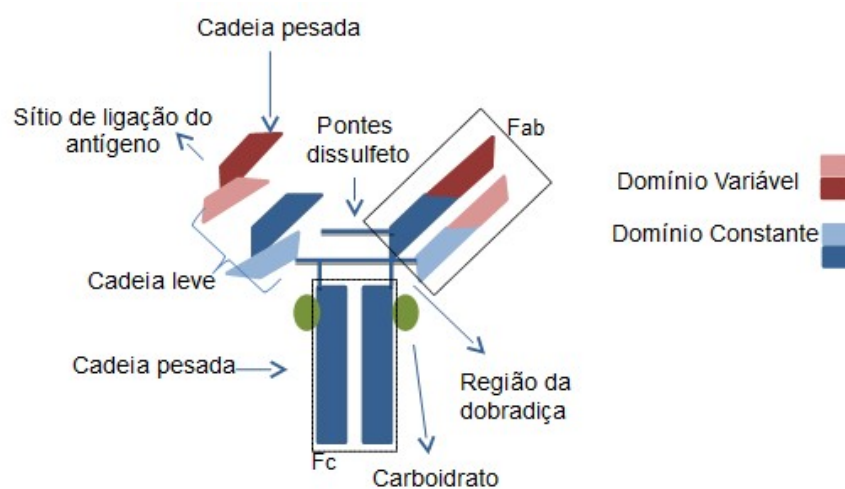


Fig. 4 Estrutura de uma imunoglobulina IgG, onde é possível observar as diferentes regiões que a constituem (Adaptado de Canhas, 2011).

As imunoglobulinas possuem como unidade básica duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. As cadeias dobram-se em regiões denominadas de dobradiça. Cada cadeia leve ou pesada apresenta uma região constante e uma região variável, também designadas de domínios como é visível na Fig.4. Uma imunoglobulina de unidade básica apresenta dois locais de ligação ao antígeno e a sua estrutura tem a forma de Y.

Na Fig.4 é possível observar também as pontes dissulfeto que ligam as cadeias entre si, a região de dobradiça que confere flexibilidade à molécula, uma vez que não se trata de uma molécula reta. A molécula com esta estrutura é denominada monomérica e representa a unidade básica do anticorpo. No entanto, a estrutura das imunoglobulinas pode ser dimérica, no caso da IgA, com duas unidades básicas, ou pentamérica, no caso da IgM, com cinco unidades básicas ligadas com uma cadeia “J” como é possível observar na Fig.5 (Harris & Winter, 2012).

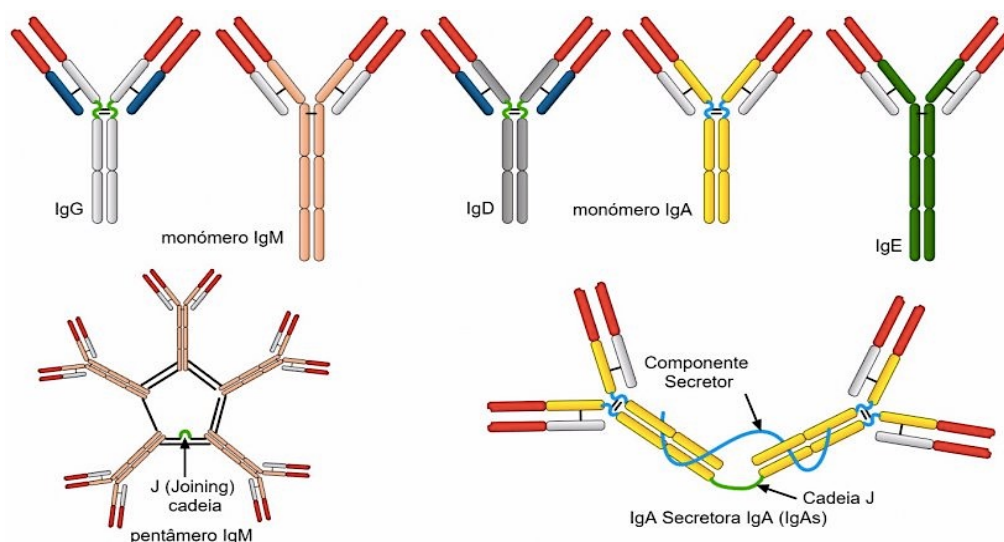


Fig.5 Estrutura das principais imunoglobulinas IgG, IgA, IgD e IgE com uma estrutura monomérica, IgA secretora com estrutura dimérica e IgM com estrutura pentamérica e monomérica (Martelli *et al*, 2017).

Os braços da estrutura em forma de Y podem sofrer clivagem proteolítica o que permite obter fragmentos de imunoglobulinas, que têm interesse do ponto de vista experimental e terapêutico. A clivagem pela papaína gera dois fragmentos de ligação ao antígeno (Fab) e um fragmento (Fc) com funções de ligação à superfície das células e de ativação do complemento.

As imunoglobulinas estão divididas em classes ou isótopos que são determinados pelas cadeia pesadas. Existem cinco classes de cadeia pesadas denominadas *gama*, *alfa*, *mu*, *delta*, *épsilon* e ao combinarem com as cadeias leves, que são de dois tipos *lambda* e *kappa*, vão originar as cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. As imunoglobulinas apenas podem conter um tipo de cadeia leve, lambda ou kappa, e nunca as duas (Harris & Winter, 2012).

As imunoglobulinas IgG e IgA podem ainda apresentar subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA1, IgA2) que correspondem a diferenças alélicas no genes das pesadas originando a variabilidade.

Tabela3 –Estrutura e Características das Imunoglobulinas (Adaptado de Delves *et al*, 2017).

| Imunoglobulina | Estrutura | Características |
|----------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------|
| IgA | Monomérica | Presente no trato gastrointestinal, respiratório e urogenital. |
| | Dimérica | Presente na secreção das mucosas. |
| IgG | Monomérica | Imunoglobulina responsável pela imunidade adquirida. |
| IgD | Monomérica | Está presente na membrana dos linfócitos B como local de ligação (BCR). |
| IgE | Monomérica | Está presente em processos alérgicos e parasitários. |
| IgM | Monomérica | Está presente na membrana dos linfócitos B como local de ligação (BCR). |
| | Pentamérica | Presente no soro e é secretada precocemente na resposta imune adquirida. |

As imunoglobulinas diferem em tamanho, carga elétrica, em composição de aminoácidos e no conteúdo de carboidratos. Do ponto de vista eletroforético, as imunoglobulinas apresentam um padrão de heterogeneidade, desde a fração alfa até à fração gama de um soro normal (Morrison *et al*, 2019).

2.2 Alterações nas Imunoglobulinas

A síntese de um clone de células do plasma pode produzir imunoglobulinas que são clones umas das outras. Este aumento de clones de células plasmáticas, pode indicar malignidade. O crescimento e proliferação destas células está associado ao aparecimento de imunoglobulinas monoclonais. Esta imunoglobulina monoclonal pode evoluir significativamente e dominar toda a zona das imunoglobulinas na eletroforese de proteínas séricas. Nas neoplasias das células do plasma existe uma desregulação evidente da síntese de imunoglobulinas. Este distúrbio pode levar a um excesso de produção de imunoglobulinas de cadeias leves. O aumento de cadeias leves livres pode desencadear patologias como a amiloidose (Harris & Winter, 2012).

O mieloma múltiplo é uma neoplasia das células plasmocíticas caracterizada pela proliferação clonal de células malignas na medula óssea. Num sistema imunitário normal, a medula óssea produz uma extensa variedade de linfócitos B com características próprias que permitem neutralizar diferentes antígenos. Os linfócitos B sofrem rearranjos genéticos, denominados recombinação V(D)J, que introduz variabilidade na região variável da imunoglobulina. Se existir exposição a antígeno, os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos que segregam imunoglobulinas específicas para este antígeno. O sistema imunitário regula-se até que estas células deixem de produzir imunoglobulinas específicas, com a diminuição da presença do antígeno (Morrison *et al*, 2019).

No mieloma e em outras gamopatias, os linfócitos B sofrem modificações quer genéticas, quer microambientais. Estas modificações contribuem para a alteração e proliferação das células linfocíticas, levando à produção de um clone de células plasmocíticas que apenas segregam uma imunoglobulina monoclonal (Morrison *et al*, 2019). Esta imunoglobulina monoclonal pode ser IgA, IgG, IgM, IgD ou IgE, compostas por duas cadeias leves e duas pesadas ligadas por pontes dissulfeto como é possível observar na Fig.4. A imunoglobulina monoclonal pode ser composta por uma cadeia leve apenas (kappa ou lambda) ou raramente por uma única cadeia pesada (Morrison *et al*, 2019).

Para conhecer e compreender uma patologia de natureza monoclonal é necessário ter sempre presente o processo de resposta imunológico, em que ocorre maturação dos linfócitos B e a síntese das imunoglobulinas. Quando ocorrem alterações como referido anteriormente, são responsáveis por estas doenças. As imunoglobulinas são proteínas com diferentes estruturas e com uma constituição muito própria. É através da utilização de

técnicas laboratoriais como as que a seguir se descrevem que é possível caracterizar e identificar as imunoglobulinas monoclonais responsáveis por diferentes tipos de patologias.

Parte IV

1. Proteínas séricas

Com exceção das imunoglobulinas e das hormonas a maioria das proteínas plasmáticas são sintetizados nos hepatócitos e libertadas na corrente sanguínea. Como mencionado anteriormente o soro e o plasma são diferentes na sua formação e constituição. O soro e o plasma diferem na sua concentração de proteínas e tipo de moléculas. Na verdade, o soro é isento de fibrinogénio e de muitos fatores proteicos associados ao processo de coagulação, que são consumidos durante a formação do coágulo, antes da centrifugação.

O plasma é composto por 93% de água e aproximadamente 7% de material sólido, proteínas e eletrólitos. A concentração de proteínas é de 70 a 80 miligramas por mililitro de plasma. Nas análises clínicas laboratoriais e quando se pretende realizar a eletroforese de proteínas utiliza-se soro e não plasma para que não exista interferência do fibrinogénio na eletroforese (Harris & Winter, 2012).

A composição das proteínas no soro pode variar consoante as condições fisiológicas e patológicas do paciente. A existência de danos celulares ou mudanças no metabolismo, que ocorrem numa variedade de doenças, são responsáveis por variações na concentração das proteínas séricas bem como na quantidade de frações proteicas observadas em eletroforese (Harris & Winter, 2012).

As proteínas produzidas pelo sistema linfóide são essencialmente as imunoglobulinas, que são produzidas por diferentes clones de plasmócitos, ou seja as imunoglobulinas são policlonais. As variações que apresentam nos aminoácidos vão resultar em migrações distintas num sistema de eletroforese.

2. Determinação de Proteínas Séricas por Eletroforese

A análise das proteínas com interesse clínico teve o seu início em meados do século XIX, e no início de século XX já existia distinção entre albumina e globulinas, o que teve a sua influência na avaliação de patologias renais. Os estudos da mobilidade eletroforética das proteínas foram inicialmente desenvolvidos por Tiselius em 1930 e envolviam um meio de suporte líquido num tubo em forma de U. Também utilizava um sistema ótico, que detetava a luz refratada pelas proteínas à medida que circulavam no tubo. O líquido ou

tampão entrava em contacto com os eléctrodos e quando era adicionada uma corrente eléctrica as proteínas moviam-se em direcção ao ânodo. O desenvolvimento da eletroforese de zona vem trazer um meio de suporte estável, em que as proteínas podiam migrar, ser coradas e quantificadas. O primeiro meio de suporte usado foi o papel de filtro em 1937, contudo só na década de cinquenta é que estas técnicas foram simplificadas e rigorosamente alteradas para uso em laboratório clínico. A eletroforese em papel de filtro apresentava limitações como o facto de ser muito lenta, sendo necessário várias horas para conseguir uma separação adequada das proteínas, a sua resolução era fraca e com bastantes problemas na absorção de substâncias não proteicas. Estes problemas obrigaram a uma procura de outros meios de suporte para a eletroforese e que surgiram com o acetato de celulose e o gel de agarose (Keren, 2003).

A eletroforese é uma técnica laboratorial que pode ser utilizada para separar moléculas, como as proteínas do soro ou da urina, usando um campo eléctrico. Esta técnica permite separar as diferentes proteínas em bandas consoante as suas características, carga e peso molecular. A razão pela qual ocorre esta separação e migração das diferentes proteínas, quando expostas a um campo eléctrico, é devida ao facto de as proteínas apresentarem aminoácidos ionizáveis, que lhes permite ter carga negativa ou positiva e assim ter um comportamento facilmente reconhecido.

As proteínas, são sujeitas a uma força provocada por um potencial eléctrico formado devido aos polos positivo e negativo, e irão migrar consoante a sua carga e peso molecular, e de seguida coradas com um corante específico, como o azul de Coomassie ou nitrato de prata. Após a coloração é possível observar as diferentes bandas de proteínas (Georgiou, 2008). Através de técnicas como a densitometria é possível obter um gráfico com a representação das bandas obtidas por eletroforese, ou seja, as bandas coradas são convertidas em frações.

A determinação da concentração das diferentes frações de proteínas tornou-se também possível de forma automatizada, através de sistemas informáticos que com a concentração total das proteínas no soro e as percentagem de cada fração de proteínas conseguem obter as concentrações em g/L de cada fração (albumina, alfa1, alfa2, Beta e gama).

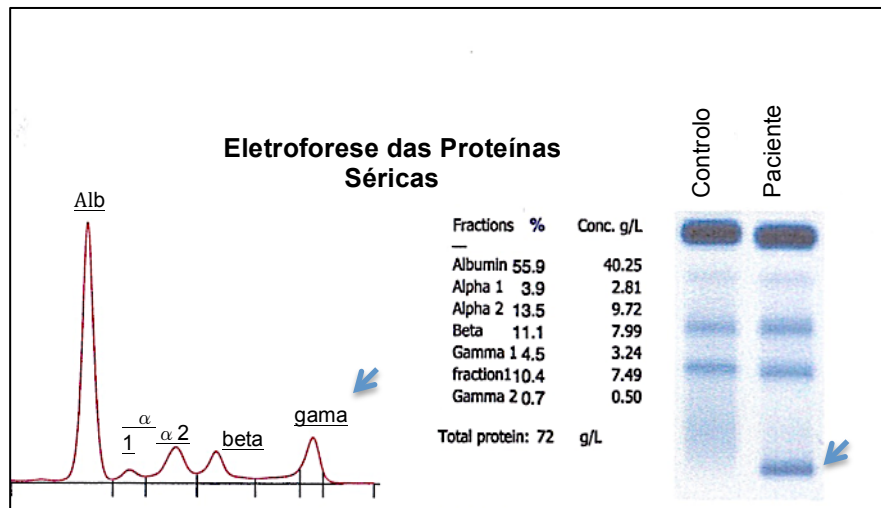


Fig.6-Comparação entre as bandas eletroforética de um soro de controlo normal e de um soro de um paciente com uma banda anormal, na fração gama. Na representação gráfica é possível observar um pico suspeito da presença de uma proteína monoclonal (Adaptado de Morrison *et al*, 2019).

Na interpretação de uma eletroforese sérica é importante ter em consideração a presença de bandas anormais, em comparação com o soro de controlo normal, nas diferentes frações proteicas: albumina, alfa 1, alfa 2, beta 1 e beta 2, e ainda a fração gama. Na Fig.6 é possível observar uma banda anormal suspeita de proteína monoclonal, na fração gama, quando comparada com um soro de controlo normal.

As razões que levam o clínico a prescrever uma eletroforese de proteínas sérica ou urinária podem estar associadas a sintomas de dor óssea, falha renal sem qualquer motivo, anemia de causa desconhecida, proteinúria, hipercalcemia, cardiomiopatia, valor de proteínas totais elevado e albumina baixa (devido a elevada concentração de imunoglobulinas) (Lee *et al*, 2017).

As patologias malignas mais graves, como o Mieloma Múltiplo e a Amiloidose, são detetadas com a ajuda de técnicas laboratoriais como a eletroforese de proteínas séricas e urinárias, por vezes ainda antes de existirem sintomas físicos da doença. No Mieloma uma banda monoclonal pode ser facilmente observável enquanto que na Amiloidose este facto pode não ocorrer sendo mais fácil de identificar a presença de cadeias leves livres na urina. Este facto acontece porque as cadeias leves livres são facilmente filtradas no glomérulo e são representadas como uma banda monoclonal na eletroforese das proteínas urinárias não aparecendo na eletroforese sérica destes pacientes (Lee *et al*, 2017).

No que respeita às proteínas de inflamação, é importante distinguir alterações que indiquem uma inflamação aguda, crónica ou ambas. Na eletroforese urinária de proteínas é também importante ter em conta a presença de banda anormais ou a ausência de bandas normais, que tal como na eletroforese de proteínas séricas pode indicar a presença de uma banda monoclonal mas, que na urina está associada a uma cadeia leve livre.

2.1 Eletroforese em Acetato de Celulose e em Gel de Agarose

A eletroforese em acetato de celulose foi o método mais usado durante vários anos, sendo superior ao papel de filtro porque, ocorria pouca adsorção do soro no ponto de aplicação, a separação das principais bandas de proteínas era bem definida e a rapidez de resolução muito maior (Keren, 2003).

A eletroforese em acetato de celulose realizada a pH 8.9 permite a observação de cinco a seis bandas: albumina e quatro a cinco globulinas, em que cada fração, alfa 1, alfa 2, beta e gama. Por vezes é possível observar a banda beta dividida em beta 1 e beta 2, com um soro fresco e um tampão com cálcio ionizado (Visconti, 2002).

O sucesso deste meio de suporte deve-se à sua simplicidade, à sua reprodutibilidade, a uma quantificação das proteínas por densitometria bastante fiável e ainda, apresentava custos relativamente baixos. No entanto, este tipo de eletroforese apresentava alguns limites na sua sensibilidade, como por exemplo quando surgiam anomalias subtis nas bandas, que poderiam ser gamopatias monoclonais, especialmente na região da alfa 2 e beta e que muitas vezes não eram detetadas (Keren, 2003).

O gel de agarose utilizado como suporte em eletroforese, tem uma estrutura química complexa. O agar é um polissacarídeo e é dele que é produzida a agarose. A agarose purificada reduz o efeito endosmótico, no entanto alguns fabricantes usam agarpectina, também proveniente do agar, para promover a endosmose. Na eletroforese de proteínas é importante existir um fluxo forte em direção ao cátodo, para que sejam visíveis bandas monoclonais se existirem, e para que se afastem as proteínas do seu ponto de origem. O afastamento é importante para que não se registem anormalidades e distorções no ponto de aplicação. Este facto pode ser especialmente importante quando existem crioglobulinas a precipitar no ponto de aplicação da amostra.

A agarose é um polissacarídeo livre de grupos ionizados e tem vantagem por ter pouca afinidade com as proteínas permitindo, depois de corado e seco, uma boa quantificação pelo densitómetro e consequentemente uma eletroforese de alta resolução (Pardini, 2003).

Utilizando o acetato de celulose ou o gel de agarose, é necessário experiência e conhecimento para valorizar ou não determinados aspetos das bandas obtidas na representação gráfica das proteínas. É um método que tem vindo a ser substituído pela capilaridade.

A autora utilizou ambos métodos, quer o gel de agarose, quer o acetato de celulose e pôde constatar as dificuldades na interpretação de traçados e a importância de um soro fresco, não hemolisado e sem fibrinogénio na obtenção de um resultado fiável.

2.2 Eletroforese por Capilaridade

Os equipamentos automatizados onde a eletroforese é realizada por capilaridade apresentam resultados mais detalhados, são mais autónomos, com maior precisão e mais rápidos. A quantidade de amostra de soro ou urina que necessitam é bastante pequena (Bossuyt, 2003).

O MINICAP (Sebia) representado na Fig.8 é um equipamento que utiliza a capilaridade, o que permite maior precisão na separação das bandas de proteínas e na interpretação dos resultados quando comparado com meios de suporte como o acetato de celulose ou gel de agarose.

A eletroforese de proteínas por capilaridade utiliza como método a separação baseada num fluxo através de um tubo capilar de sílica com características para diferenciar diversas moléculas de acordo com o seu tamanho e propriedades. É um método semelhante à cromatografia líquida de alta performance (HPLC), possuindo um capilar com propriedades comuns à agarose. Este método deteta e quantifica as banda de proteínas sem a necessidade de densitometria. Por ser um método de alta resolução, permite a separação mais eficiente das bandas e a observação de picos existentes quer na zona da beta 1 e beta 2, quer na zona da gama. É um ganho adicional na avaliação de pacientes com gamopatias monoclonais. Os ensaios clínicos em doentes com proteínas monoclonais demonstram que a eletroforese por capilaridade tem uma sensibilidade de 93% a 95%, a eletroforese em gel de agarose de 86% a 91% e a eletroforese em acetato de celulose tem uma sensibilidade de apenas 74%. A eletroforese por capilaridade tem ainda a particularidade de não detetar o fibrinogénio e apresentar uma maior taxa de deteção de bisalbuminemia (Harry & Winter, 2012).

Na capilaridade as moléculas de proteínas são separados pela sua mobilidade eletroforética num tampão alcalino. Os equipamentos que realizam este método podem ter dois ou mais capilares. No caso do MINICAP, são utilizados dois capilares de sílica em que as amostras de soro são diluídas num tampão e os capilares são preenchidos com tampão de separação com pH de 10. Após diluição, as amostras são injetadas no capilar e é aplicada de seguida uma voltagem elevada que vai permitir a separação das proteínas de acordo com a sua carga. A migração das proteínas depende da eletroendosse e da carga elétrica associada a cada molécula. A maioria das proteínas séricas apresenta um ponto isoelétrico inferior a 10, logo encontram-se carregadas negativamente a um pH de 10 e como resultado vão migrar em direção ao eletrodo positivo ou ânodo, quando é aplicada uma voltagem de cerca de 10 kV (Bossuyt, 2003).

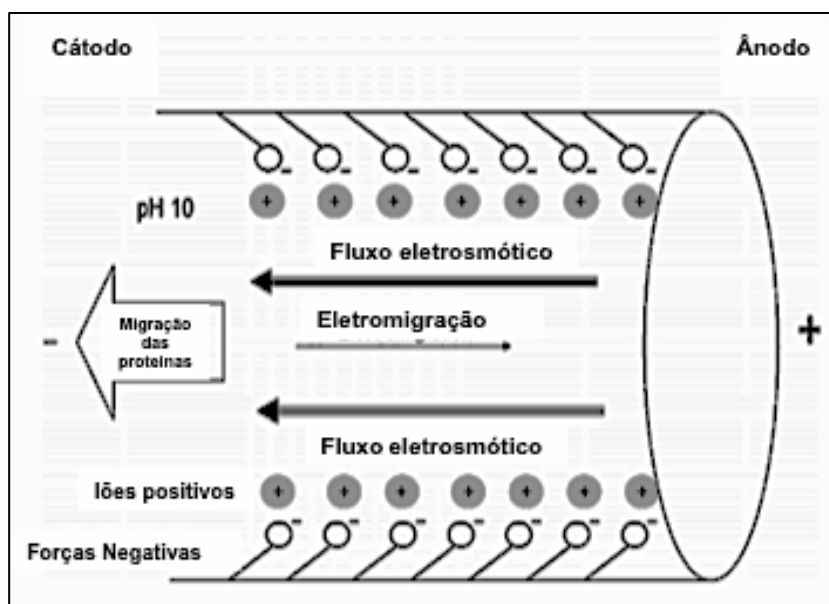


Fig.7 Esquema representativo do fluxo eletroendosmótico contrário, que contribui para a separação das proteínas (Adaptado de Bossuyt, 2006).

A eletroendosmose é um fenómeno a considerar na capilaridade, uma vez que a força do fluxo promovida pelos iões positivos, em direção ao cátodo, é superior ao movimento eletroforético das proteínas, em direção ao ânodo. Estas duas forças opostas, quando ocorrem ao mesmo tempo levam à separação das proteínas por zonas. A eletroendosmose ocorre devido à componente Si-OH presente no interior da parede dos capilares. Este composto fica carregado negativamente e quando em contacto com o tampão alcalino, os iões positivos são atraídos para o polo negativo ou cátodo, o que origina um fluxo contrário ao da migração das proteínas (Harry & Winter, 2012).

A quantificação das frações proteicas ocorre num comprimento de onda específico de 210nm para as proteínas séricas. A eletroforese por capilaridade não requer a utilização da coloração para visualizar a separação das proteínas. A quantificação é obtida por uma janela ótica no capilar com um comprimento de onda de 210nm que corresponde à absorção máxima das ligações peptídicas (Harry & Winter, 2012).

Após a realização da análise, os capilares são desinfetados e preparados com novo tampão para receber novas amostras. Este ciclo de trabalho acontece quase automaticamente de uma forma autónoma e bastante rápida (SEBIA, 2019).

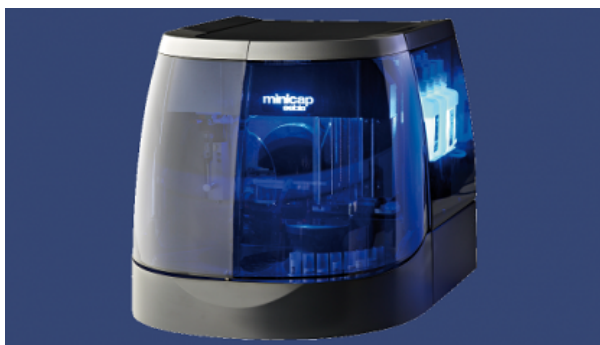


Fig.8 Autoanalisador MINICAP realiza eletroforese por capilaridade (SEBIA, 2019).

Assim, a realização da eletroforese de proteínas no soro com este método permite detetar com maior sensibilidade modificações na mobilidade de uma proteína ou grupo de proteínas, detetar algumas alterações genéticas que condicionam a posição das bandas, devido a alterações na estrutura das proteínas ou na duplicação de bandas, detetar complexos imunes, detetar associações de proteínas com outras moléculas, provocando alterações na localização e homogeneidade da banda proteica.

A utilização de soros de controlo normais e patológicos, e a sua comparação com os resultados dos pacientes permite um controlo da forma como funciona o autoanalisador. As frações devem ser observadas atentamente, devendo ser enfatizada a fração que se destaque, no entanto, certas variações podem ser típicas de determinadas patologias e o diagnóstico não deve ser feito unicamente com o resultado da eletroforese.

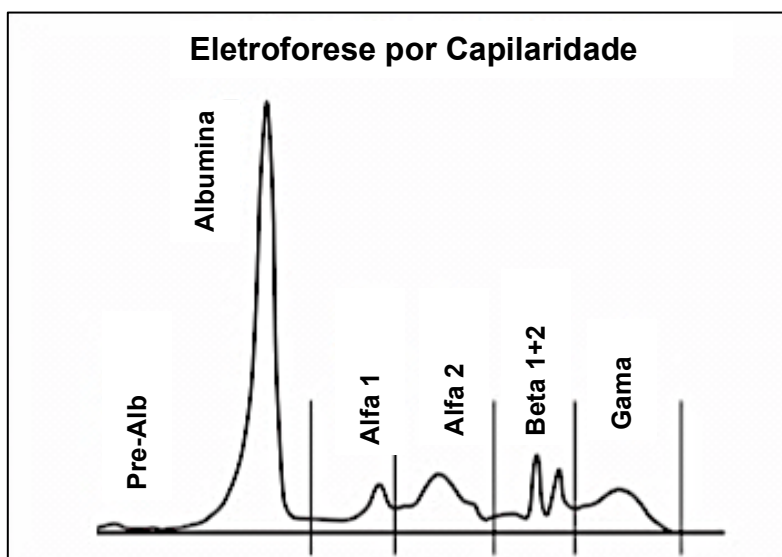


Fig.9 Eletroforese das proteínas séricas normal obtida por capilaridade com as diferentes frações assinaladas (Adaptado de Keren, 2003).

3. Eletroforese das Proteínas: interpretação gráfica

A principal utilização da eletroforese de proteínas séricas é auxiliar a rastrear doentes com patologias associadas às proteínas presentes no soro, nomeadamente o mieloma múltiplo, amiloidose e outras patologias. A eletroforese separa as proteínas tendo por base as suas propriedades físicas e como migram em conjunto formando bandas com diferentes intensidades. É uma análise utilizada na avaliação de indivíduos com idade superior a 50 anos e com alguns sintomas como anemias, cansaço, dores, presença de proteína na urina, sem existir uma razão aparente para apresentar estes sintomas.

A separação das frações proteicas pode ocorrer num meio poroso de gel de agarose ou acetato de celulose ou num capilar com tampão de migração, consoante a técnica utilizado por cada laboratório. A técnica que atualmente é mais utilizada é a capilaridade devido às vantagens apresentadas anteriormente. A interpretação do resultado da eletroforese deve ser analisado com o maior detalhe.

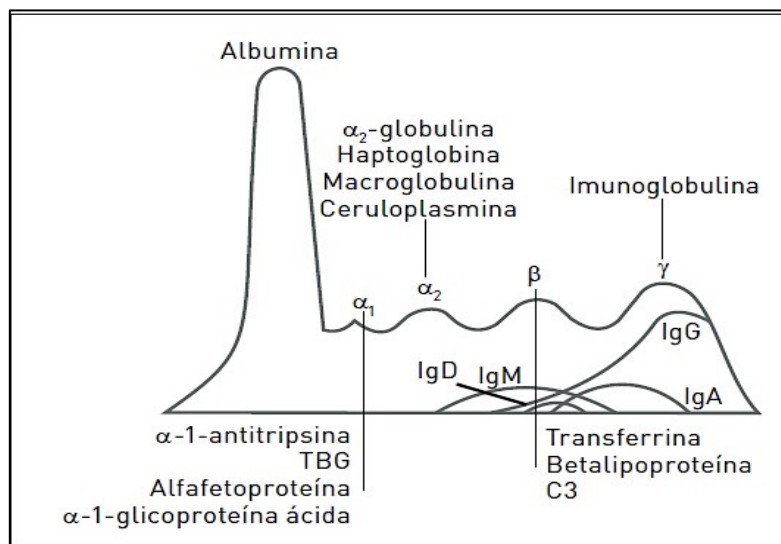


Fig10. Principais proteínas presentes nas diferentes frações da eletroforese de proteínas (Silva *et al*, 2008).

Numa curva eletroforética normal como a observada na Fig.10, ocorre uma separação principal entre a albumina e as globulinas. Para reconhecer as alterações que possam surgir na eletroforese de proteínas é necessário conhecer as variações que as proteínas podem apresentar e como consequência as modificações que a curva eletroforética pode apresentar. Estas variações incluem variantes fenotípicas, a idade do indivíduo, alterações na síntese ao nível da função hepática ou por síndrome de deficiência antibiótica, má nutrição, doença renal, má absorção, inflamação, malignidade, hormonas (gravidez, contraceptivos, mau funcionamento da tiróide) ou medicação (imunossuppressores) (Regeniter & Siede, 2018).

Uma interpretação da curva eletroforética inclui a quantificação das proteínas totais e o valor percentual de cada fração de proteínas deve ser convertido a g/L. Os valores absolutos das concentrações são essenciais para interpretar corretamente a eletroforese. No entanto, os valores de referencia utilizados pelos laboratórios para comparar com os resultados obtidos apenas permitem uma interpretação parcial. É necessário realizar uma observação pormenorizada da curva eletroforética porque, por exemplo, se registrar um aumento na fração das globulinas, este aumento pode indicar uma gamopatia monoclonal mas também podem ocorrer interferências com o mesmo efeito. Assim, é essencial procurar a existência de frações ou bandas adicionais, formas assimétricas das frações, ou uma elevação anormal da fração. Esta análise exaustiva pode ser automatizada utilizando softwares matemáticos com análise da curva (Regeniter & Siede, 2018).

A pré-albumina é a fração que aparece primeiro, pois é a proteína de migração mais rápida e a fração gama a mais lenta, logo aparece em último. A pré-albumina ou transtiretina é uma proteína de transporte para a tiroxina (T₄) e em associação com a albumina e transferrina são um forte indicador do estado nutricional do indivíduo. O seu aumento pode estar associado a gravidez ou síndrome nefrótica, terapia com corticoesteróides ou anti-inflamatórios não esteroides e linfoma de Hodgkin. A sua diminuição pode estar relacionada com má nutrição, doença de fígado e a um processo inflamatório agudo. A pré-albumina nem sempre é fácil de observar na separação eletroforética uma vez que apresenta uma baixa concentração. Na maioria dos casos não se dissocia da albumina e é mais difícil de observar usando suportes como o acetato de celulose. Com a capilaridade a sensibilidade é maior e é observada mais frequentemente (Morrison *et al*, 2019).

A albumina é a principal proteína existente no soro, cerca de 60% do total de proteínas séricas.

A albumina é uma proteína de 69 kDa produzida no fígado e com uma concentração normal média no sangue entre 35-55 mg/dL. É altamente hidrofílica sendo a principal transportadora de ácidos gordos, enzimas, bilirrubinas, hormonas da tiroide, drogas e produtos tóxicos. É também responsável por controlar os fluidos entre os compartimentos intra e extracelulares e ainda é uma fonte de aminoácidos. Através da observação eletroforética a albumina apresenta uma banda de forma regular que depende da sua homogeneidade bioquímica. Um aumento desta proteína está relacionado com processos de desidratação devido a perda de água pelo organismo por diarreia, vômitos ou sudorese prolongada. A diminuição é muitas vezes devida a doença de fígado, subnutrição, perda de proteína devido a falha renal, queimadura severa ou hemorragia. Pode também ocorrer diminuição em caso de inflamação aguda, gravidez e em tumores. Existem casos raros como a bisalbuminémia (Fig.11D) que corresponde maioritariamente a alterações genéticas autossómicas, em que são visíveis duas bandas na zona da albumina. São dois tipos de albumina que diferem na sequência de aminoácidos, no mesmo indivíduo, e com mobilidades eletroforéticas diferentes. Estas duas bandas apresentam praticamente a mesma concentração, com uma ligeira prevalência da banda que migra para a posição

normal da albumina. Assim, existe uma albumina normal e outra que é um componente de migração um pouco mais lento. Esta condição não está associada a um significado patológico (Regeniter & Siede, 2018).

A analbuminémia é também rara e é representada na curva por uma banda achatada, quando a concentração de albumina é muito baixa, quase inexistente a banda quase não aparece na curva eletroforética. É uma alteração congênita e quantitativa.

A isalbuminémia compreende duas bandas na região da albumina de dimensões idênticas (Fig.11C).

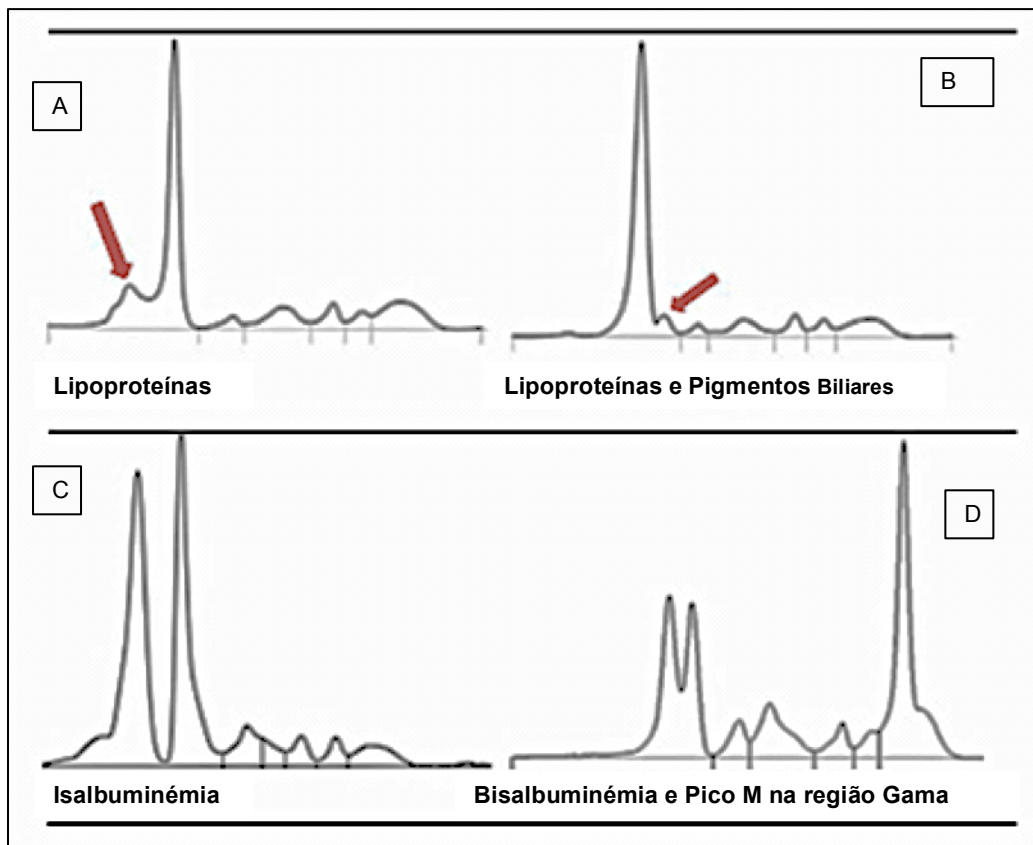


Fig.11- Irregularidades presentes em curvas eletroforética na região da albumina (Adaptado de Regeniter & Siede, 2018). Em A e B é possível observar como as lipoproteínas e pigmentos biliares podem interferir no gráfico elctroforético. Em C observa-se a presença de uma albumina dividida em duas bandas separadas e em D é possível observar uma banda de albumina dividida (bisalbuminémia), e uma banda gama com um pico M.

Na Fig.11 estão representadas quatro curvas eletroforética utilizando eletroforese capilar com irregularidades na região da albumina. A presença de lipoproteínas ou pigmentos biliares na região da albumina, como é possível observar, formam bandas adicionais nesta região. A proteína monoclonal M não é registada na região de migração da albumina.

Após a migração da albumina segue-se a banda alfa 1 composta por proteínas como a alfa1-antitripsina, a alfa 1-fetoproteína, a alfa1-glicoproteína ácida ou oromucoide e a alfa

lipoproteína de alta densidade (HDL). A alfa1-antitripsina é a proteína que cora mais facilmente na eletroforese em acetato de celulose e é a proteína em maior abundância e com maior importância clínica nesta fração (Morrison *et al*, 2019).

A alfa 1-glicoproteína não cora com corantes convencionais de proteínas, pelo que a banda da alfa 1 corada reflete toda a alfa 1-antitripsina existente no soro (O'Connell, *et al*, 2005).

A alfa1-antitripsina é responsável por 90% da atividade dos inibidores das proteases no plasma, atuando na regulação das proteases envolvidas na coagulação e em muitas ações fisiológicas e é uma proteína da fase aguda com valores elevados no soro em caso de inflamação aguda. A regulação genética da síntese desta proteína envolve um grande número de alelos, cuja expressão pode resultar na síntese de variações sem relevância clínica. Aproximadamente 95% da população apresenta valores de alfa 1-antitripsina normal. No entanto, existem certas anomalias hereditárias que podem causar uma síntese deficiente ou mesmo impedir a sua libertação na corrente sanguínea com implicações clínicas relevantes (Harry & Winter, 2012).

Um decréscimo da alfa1-antitripsina pode indicar doença pulmonar, especialmente enfisema. Os indivíduos heterozigóticos apresentam uma banda corada com pouca intensidade com 30 a 50 % dos valores mais baixos que os normais. Em homozigóticos os valores diminuídos variam com a etnia e por vezes são quase inexistentes, a banda está ausente. Na zona da alfa 1 pode ser possível observar, em certos casos raros, a presença de uma banda dupla que pode indicar a existência de uma variante da alfa1-antitripsina ou um componente monoclonal e em alguns casos reflete a presença de alfa-fetoproteína. O aumento da banda alfa 1 indica o aumento de alfa1-antitripsina, que por sua vez reflete um processo inflamatório agudo ativo (Regeniter & Siede, 2018).

As irregularidades fisiológicas observadas na curva de eletroforese são originadas pelas variações fenotípicas da alfa1-antitripsina. O aumento da alfa1-glicoproteína ácida está associado a alcoolismo crónico, poliartrite e autoimunidade, lúpus. A presença de um pico M nesta região é também muito rara (Regeniter & Siede, 2018).

A fração alfa 2 é observada como uma banda larga de cor intensa quando corada em acetato de celulose e contém como componentes proteicos: a alfa 2-macroglobulina (aniónica), a haptoglobina (catiónica) e a ceruloplasmina. As proteínas com maior interesse clínico nesta fração são a alfa 2-macroglobulina e a haptoglobina (Morrison *et al*, 2019).

A alfa 2-macroglobulina é um inibidor de proteases como a tripsina e a plasmina é também uma proteína transportadora de insulina, estrogénios, nos recém nascidos transporta a hormona de crescimento. As crianças apresentam concentração de alfa 2-macroglobulina mais elevada, podendo ser 2 a 3 vezes superior ao valor normal em adultos e em grávidas também se verifica aumento (Visconti, 2002).

A haptoglobina é uma glicoproteína com diferentes fenótipos (Hp1-1, Hp1-2 e Hp2-2), diferentes pesos moleculares e diferentes mobilidades eletroforéticas. A sua principal função é ligar-se às hemoglobinas (HbA, HbF, HbS e HbC) e circular livremente na corrente

sanguínea. A hemoglobina liga-se à haptoglobina num rácio de 1:1, formando um complexo estável que não é eliminado pelo rim. Este complexo pode ser facilmente reutilizado originando aminoácidos e ferro quando é necessário. Esta associação impede perdas de ferro, conservando assim as reservas de ferro (Visconti, 2002).

Na interpretação da fração alfa 2 deve ser tido em consideração o complexo hemoglobina-haptoglobina com amostra de soro hemolisada, que pode originar um traçado erróneo.

O aumento das proteínas alfa 2 está associado a insuficiência adrenal, terapêutica com adrenocorticoides, diabetes mellitus, num estado mais avançado da doença, e síndrome nefrótico. Pode ainda ocorrer aumento em situações de inflamação aguda e crónica, enfarte do miocárdio e em casos de neoplasias. A haptoglobina é também considerada proteína de fase aguda. A diminuição pode dever-se a malnutrição, anemia megaloblástica, enteropatias com perda proteica, doença de fígado severa, doença de Wilson (O'Connell *et al*, 2005).

As principais irregularidades observadas na curva de eletroforese estão relacionadas com as variantes da haptoglobina, antibióticos e agentes radioativos de contraste, bem como com o aumento e diminuição das concentrações destas proteínas (Regeniter & Siede, 2018).

A fração beta dependendo do sistema eletroforético utilizado pode migrar como uma única banda ou apresentar dois picos, a beta 1 e a beta 2. A beta 1 é composta maioritariamente por transferrina e a beta 2 por beta-lipoproteína, complemento C3 e C4. As imunoglobulinas IgA, IgM e alguma porção da IgG podem também ser identificadas na fração beta (Harris & Winter, 2012).

A transferrina é uma glicoproteína produzida no fígado com um papel muito importante no metabolismo do ferro. A sua função é a de se ligar ao ferro e transportá-lo entre os tecidos e a medula óssea, onde a hemoglobina é sintetizada. As diferentes formas de transferrina podem ser observadas no mesmo indivíduos e ocorrer ligeira divisão na banda beta 1, que pode ser devida a uma condição rara apresentada por heterozigóticos ao produzirem dois tipos diferentes de cópias desta molécula, ou em situações de doença de fígado grave e alcoolismo. Assim, o aumento de beta 1 e beta 2 globulinas pode dever-se a cirrose biliar, carcinoma, doença de Cushing's, diabetes mellitus, hipotireoidismo, anemia por deficiência de ferro, hipertensão, poliartrite nodosa, gravidez. A diminuição pode ocorrer em casos de malnutrição (Harris & Winter, 2012).

A fração beta 2 é constituída pelo complemento C3 presente na zona catiónica e é a segunda proteína mais abundante da fração beta. Um aumento do complemento C3 pode ser observado como resposta na fase aguda inflamatória e obstrução biliar. Uma diminuição pode acontecer em situações de infeção, lúpus e vasculite autoimune (Morrisson *et al*, 2019).

A última fração presente na curva da eletroforese de proteínas séricas corresponde às gamaglobulinas. É a zona que apresenta maior interesse clínico, é o local de migração das

imunoglobulinas IgA, IgG, IgM, (IgD e IgE em pequenas concentrações), e onde se podem observar mais frequentemente as bandas monoclonais. A fração gama apresenta-se como uma região difusa, mais corada ao meio que nas extremidades. Uma boa resolução da fração gama pode ser determinante na deteção de alterações qualitativas e quantitativas e ajudar significativamente a direccionar o diagnóstico clínico. As variações na fração gama ocorrem de acordo com uma maior ou menor intensidade de coloração, a presença de picos alterando a forma difusa da banda, são também situações de relevância clínica (Morrison *et al*, 2019).

Um aumento na fração gama pode estar relacionado com diversas patologias como doença de fígado, amiloidose, infeção crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiplo, doença de Hodgkin's, macroglobulinemia de Waldenström ou gamopatia monoclonal de significado indeterminado. A diminuição pode ser devida a envelhecimento, efeito de algumas drogas, e é denominada hipogamaglobulinémia ou agamaglobulinémia (Morrison *et al*, 2019).

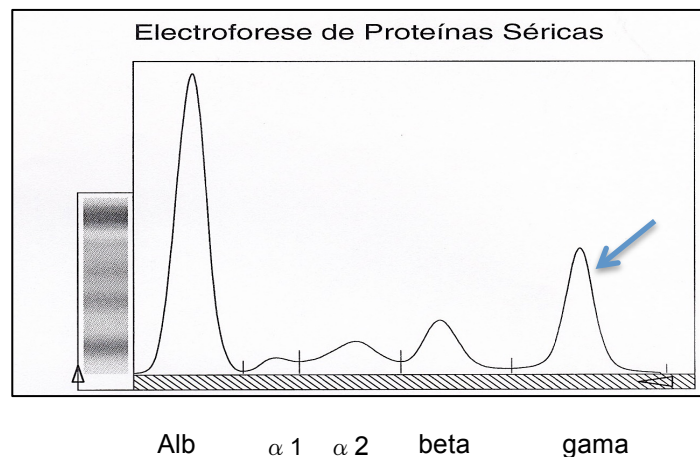


Fig.12- Eletroforese das proteínas em acetato de celulose com pico na região gama de um paciente do sexo masculino com 66 anos de idade.

Na Fig.12 é possível observar a eletroforese de proteínas de um paciente do sexo masculino com a presença de um pico na fração gama e um aumento no valor desta fração.

Nestes casos em que se observa uma banda bem definida na região da gama é necessário recorrer a outras técnicas laboratoriais para distinguir de que tipo de banda está representada na eletroforese das proteínas séricas. A técnica mais utilizada atualmente para caracterizar as bandas que surgem na eletroforese das proteínas é a imunofixação.

A imunofixação permite a diferenciar com maior sensibilidade se a banda observada é monoclonal, resultante da hiperprodução de um único clone anormal de células plasmocitárias ou linfócitos B (Kyle, 1999). É de extrema importância distinguir entre uma banda monoclonal e um aumento policlonal de imunoglobulinas, uma vez que a primeira

está associada a um processo clonal maligno ou potencialmente maligno, enquanto que um aumento policlonal pode ser devido a um processo reativo ou inflamatório (Kyle, 1999).

A imunoglobulina monoclonal é reconhecida então, como uma banda distinta denominada componente M (Bottini, 2007).

4. Interferências na Eletroforese de Proteínas Séricas

A Eletroforese de Proteínas Séricas quer em gel de agarose, quer por capilaridade está sujeita a um conjunto de interferências que pode levar a interpretações errôneas, com o surgimento de artefactos na curva eletroforética.

As interferências analíticas são causas importantes de erro laboratorial. Os laboratórios clínicos devem ter em atenção que as interferências podem ter consequências clínicas significativas quer por falha de diagnóstico, quer pela administração de tratamentos desnecessário ou excessivo. A eletroforese de proteínas séricas está sujeita a interferências de substâncias endógenas que ocorrem naturalmente, ou de patologias e problemas fisiológicos e também de fatores exógenos como a terapêutica.

As interferências endógenas incluem a hemólise, o fibrinogénio e alguns anticorpos que afetam quer a eletroforese de proteínas séricas, quer a imunofixação. Os fatores exógenos incluem contrastes radiológico, antibióticos e a utilização de terapêutica monoclonal. Estas interferências afetam as diferentes tecnologias e podem dar origem ao aparecimento de bandas anormais, podendo ser observado um falso positivo para uma gamopatia monoclonal. Existem casos em que é fácil eliminar a interferência, como no caso do fibrinogénio, porque é facilmente identificável, quando presente na eletroforese de proteínas. Noutros casos, como na terapêutica monoclonal é mais difícil eliminar porque o paciente não pode suspender a terapêutica para realizar a análise (McCudden *et al*, 2018).

4.1 Fatores endógenos de interferência

4.1.1 Fibrinogénio

A glicoproteína fibrinogénio sofre clivagem para formar a fibrina utilizada na formação do coágulo, no processo de coagulação. Quando a fase pré-analítica decorre de forma adequada, o fibrinogénio normalmente não está presente no soro usado para a eletroforese das proteínas. Contudo, o fibrinogénio pode estar presente no soro de indivíduos que fazem terapia anticoagulante de uma forma residual, ou com distúrbios no processo de coagulação. A presença de fibrinogénio na eletroforese de proteínas também pode ser devido ao indevido uso de plasma em vez de soro (McCudden *et al*, 2018).

O fibrinogénio residual quando presente na amostra de soro migra na zona da banda beta e da gama e pode ser facilmente confundido com uma banda monoclonal (Harris & Winter, 2012). Para que este facto não aconteça é importante realizar imunofixação e anticorpos anti- fibrinogénio, para ter a certeza que se trata de uma banda monoclonal.

De acordo com Morrison *et al* (2019), deve realizar-se um tratamento com trombina e proceder a nova análise. Esta é uma das razões pelas quais o soro é a amostra de eleição na eletroforese de proteínas séricas.

4.1.2. Hemólise

A hemólise é uma interferência que é conhecida do laboratório clínico e afeta diversas análises. A hemólise corresponde à rutura dos glóbulos vermelhos causando a libertação de componentes citoplasmáticos para o soro ou plasma e pode afetar os resultados dos testes de diversas maneiras. As duas principais interferências estão relacionadas com a elevada concentração de hemoglobina e com a influência direta dos componentes celulares dos glóbulos vermelhos. Os glóbulos vermelhos contêm elevadas concentrações de hemoglobina, potássio, magnésio, ferro, fosfatos, desidrogenase láctica e aspartato aminotransferase, pelo que a existência de uma ligeira hemólise sequer pode alterar o doseamento destes analitos no soro ou plasma. A hemólise afeta também, de uma forma direta, as leituras de absorvância. Uma amostra hemolisada é facilmente reconhecida quer por observação visual, quer pela utilização de índices da qualidade do soro, de uma forma automatizada. Estes índices automáticos, realizados para cada amostra de soro ou plasma, acabam por ser mais fiáveis que a observação das amostras. As causas da hemólise podem ser pré-flebotomia (hemólise *in vivo*) ou durante a flebotomia. As causas da hemólise *in vivo* são várias desde agentes microbiológicos, anemia hemolítica ou pré-eclampsia. Durante a flebotomia devido a incorreta utilização de agulhas, força de sucção, longos períodos de armazenagem, veias de baixo calibre. Noutras situações como em pacientes que realizam tratamentos de quimioterapia, ou internados de longa duração, bem como casos de anemia hemotítica autoimune, a hemólise também pode ocorrer (McCudden *et al*, 2018).

A libertação de componentes citoplasmáticos pelos glóbulos vermelhos vem afetar a eletroforese de proteínas séricas, uma vez que a hemoglobina e os complexos de hemoglobina-haptoglobina aparecem na eletroforese como bandas discretas na região da alfa 2 e na região das beta. Estas bandas podem ser mal interpretadas e consideradas erradamente como gamopatias monoclonais, facto que pode ser facilmente evitado se for tida em conta a existência de hemólise antes da realização deste teste (Morrison *et al*, 2019).

A presença de hemólise não exclui a deteção de uma banda monoclonal, esta deve ser identificada e confirmada pela imunofixação. O que se pode verificar quantitativamente é um aumento falseado no valor da alfa 2 e da beta, devido à hemólise. Nestes casos pode ser necessário recorrer a uma repetição de colheita, na esperança de obter uma amostra

não hemolisada. Este processo nem sempre é fácil em pacientes com tratamentos de quimioterapia (McCudden *et al*, 2018).

4.1.3 Crioglobulinas

A presença de crioglobulinas é também um fator de interferência a ter em conta na interpretação da eletroforese de proteínas. As crioglobulinas são imunoglobulinas que agregam e precipitam a temperaturas inferiores a 37°C. Como qualquer diminuição da temperatura pode desencadear este fenómeno, é de extrema importância manter a temperatura durante a colheita e fase pré-analítica. Uma falha na monitorização da temperatura pode levar a uma perda considerável de gamaglobulina bem como de outros constituintes das proteínas. A crioglobulinemia tem significado clínico relevante. Os pacientes com esta patologia podem ter problemas de viscosidade associados. As crioglobulinas podem ser de três tipos: Tipo I com uma componente imunoglobulina única; Tipo II, com imunoglobulinas monoclonal e policlonal; Tipo III, com imunoglobulinas policlonais. A presença de crioglobulinas pode interferir na eletroforese de proteínas quer diretamente, pela sua precipitação no ponto de aplicação no gel, originando a aparência de uma banda monoclonal e indiretamente por alterar quantitativamente as frações proteicas. A precipitação no ponto de aplicação da amostra afeta a eletroforese e a imunofixação, e a sua aparência atípica sugere que não se trata de uma banda monoclonal. Na imunofixação a presença de crioglobulinas é notória pelo aparecimento de uma banda visível em todas as pistas da imunofixação. É importante compreender qual o tipo de crioglobulina presente no soro, se for de Tipo II ou III, a interpretação incorreta de uma crioglobulina como uma banda monoclonal pode ter consequências clínicas. A realização do teste a 37°C ou o tratamento com β -mercaptoetanol pode anular este artefacto (Morrison *et al*, 2019).

4.1.4 Subclasses IgD4 elevadas

A doença associada a um aumento das IgD4 provoca distúrbios em diferentes órgãos mas não é uma complicação de fácil diagnóstico, devido aos fracos sintomas que os indivíduos apresentam. O atraso no diagnóstico pode comprometer seriamente o tratamento desta patologia, uma vez que os resultados com corticoesteroides e rituximab em fases iniciais da doença têm sido bastante favoráveis. Estes sintomas vagos levam o clínico a prescrever diversos exames e entre eles a eletroforese de proteínas, que poderá trazer mais informação ao diagnóstico. Quando se realiza a interpretação de uma eletroforese de proteínas com IgD4 elevada é necessário ter em consideração o local de migração e a restrita mobilidade destas imunoglobulinas, uma vez que podem parecer uma gamopatia monoclonal (McCudden *et al*, 2018).

Os estudos realizados demonstram que em pacientes com IgD4 elevadas se observa a presença de uma banda na região das frações beta e gama, quer em gel de agarose quer

por capilaridade. A confirmação de que se trata de uma banda policlonal terá que ser efetuada por imunofixação (Jacobs *et al*, 2014).

4.2 Fatores Exógenos de Interferência

4.2.1 Contraste Radiológico

Os contrastes radiológicos interferem mais especificamente na eletroforese por capilaridade, devido à sua capacidade de absorver luz ultravioleta. Os contaminantes radiológicos aparecem no gráfico eletroforético como picos na região da alfa 2 e da beta. É recomendado um período de espera de cinco dias antes da colheita de sangue para análise, para haja a eliminação do contraste, ou a realização da colheita antes da administração do contraste. A presença desta interferência pode indicar falsamente uma banda monoclonal, no entanto, ao realizar a imunofixação é possível confirmar que não se trata de uma gamopatia monoclonal porque a banda provocada pelo contraste não será visível (Morrison *et al*, 2019).

4.2.2 Terapia monoclonal com imunoglobulinas

Os novos tratamentos baseados em imunoglobulinas monoclonais para o mieloma múltiplo vêm trazer melhorias clínicas consideráveis. A sua utilização vem no entanto, dificultar a interpretação da eletroforese de proteínas séricas. Os tratamentos são compostos por proteína monoclonal IgG kappa em concentrações visíveis na eletroforese. Este facto pode levar a confusão clínica, investigação adicional, modificações no tratamento ou incorreta avaliação da resposta do paciente ao tratamento. O tempo de vida destas imunoglobulinas monoclonais no soro é de 4 a 9 dias, pelo que a colheita de sangue para a realização da eletroforese deve ser realizada antes de iniciar cada dosagem de tratamento. A comunicação entre todos os envolvidos no tratamento de pacientes com mieloma múltiplo é imperativa para mitigar resultados suspeitos (Morrison *et al*, 2019).

5. Imunofixação e Imunoeletroforese das Proteínas Séricas

5.1 Imunoeletroforese das Proteínas Séricas

A imunoeletroforese foi a primeira técnica prática a combinar eletroforese com imunoprecipitação para identificar e caracterizar proteínas em amostras complexas. Ao longo dos tempo, a imunoeletroforese tem evoluído e está incluída numa variedade de técnicas e o seu nome foi generalizado. É uma técnica versátil, relativamente simples de execução e económica, sem necessidade de equipamento caro. Pode ser aplicada a

qualquer fluido corporal de baixa viscosidade ou pode mesmo ser aplicada a fluidos de cultura ou extratos de tecido. Devido a estas características, a imunoeletroforese clássica permanece como uma técnica valiosa para usar no laboratório clínico (Csako, 2019).

A imunoeletroforese veio permitir um melhoramento na separação e quantificação de proteínas de fluidos biológicos e provocou um grande impacto na química proteica determinada no laboratório clínico. Esta técnica foi inicialmente desenvolvida para a deteção e identificação de paraproteínas em diagnóstico clínico, mas tem sido gradualmente substituída pela imunofixação, que apresenta melhor resolução e melhor deteção de paraproteínas de baixa concentração.

Estudos realizados desde cedo por Marshall (1980) permitiram constatar a superioridade da imunofixação no que respeita à deteção de imunoglobulinas monoclonais. No entanto, Csako (2019) salienta que a imunoeletroforese tem-se reinventado quer para utilização clínica quer para uso em investigação.

A imunoeletroforese, de uma forma simplificada combina a separação de antígenos das proteínas por eletroforese em meio semissólido, como gel, seguida de uma reação imunológica de precipitação antígeno-anticorpo. As proteínas específicas tornam-se visíveis havendo assim a sua separação e caracterização. A imunoeletroforese vem evoluindo e dá origem a diversas técnicas com o mesmo princípio.

5.2 Imunofixação das Proteínas Séricas

A Imunofixação deve realizar-se quando surge um pico ou banda no gel de agarose, ou capilaridade, ou quando existe uma forte suspeita de mieloma múltiplo, macroglobulinemia, amiloidose primária ou plasmocitoma por sintomas apresentados pelo paciente. É uma técnica com grande versatilidade, elevada sensibilidade, fácil de execução e pouco dispendiosa, se for realizada manualmente. É mais sensível e mais rápida que a imunoeletroforese, atualmente menos utilizada.

A imunofixação permite visualizar proteínas específicas *in situ* através de uma reação imunológica, com precipitação do complexo antígeno-anticorpo, seguida por separação eletroforética em gel semissólido. Com a realização da imunofixação pode detetar-se a presença de uma banda monoclonal com uma pequena quantidade do componente M. Este componente M ou proteína M é composto por uma cadeia pesada e uma cadeia leve lambda ou Kappa. Assim, se a eletroforese de proteínas do soro é equívoca ou se existe suspeita das patologias já mencionadas, o laboratório deve realizar a imunofixação usando antissoros específicos. Se a localização da banda estiver na região gama na eletroforese de proteínas séricas, então realizará imunofixação recorrendo a antissoros IgA, IgG e IgM. Se para estes antissoros o resultado for negativo então utilizar antissoros IgE e IgD (Kyle, 1999).

No diagnóstico de amiloidose, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiplo, doença de Hodgkin's, macroglobulinemia de Waldenström tanto o soro como a urina deve ser analisado para a pesquisa de proteínas monoclonais. A quantificação de imunoglobulinas e

das proteínas totais na urina de 24 horas deve ser sempre realizada. O objetivo da avaliação laboratorial através da imunofixação é demonstrar a presença, quantificar e identificar o tipo de proteína anormal presente.

No laboratório utilizou imunofixação, eletroforese e imunoprecipitação recorrendo a kits comerciais, nomeadamente o SEBIA Hydragel IF K20 Standard Mask, juntamente o Kit de Antissoros e Fixador para IF K20. Com estes kits é possível detetar proteínas monoclonais no soro humano, por eletroforese em gel de agarose. As proteínas são separadas por eletroforese em meio alcalino (pH9.2) e depois imunoprecipitadas com antissoros de especificidades diferentes: anticadeias pesadas gama (IgG), alfa (IgA) e mu (IgM) e anticadeias leves Kappa e Lambda (livres e ligadas). As proteínas depois de imunofixadas e imunoprecipitadas são coradas com violeta ácido e o excesso de corante retirado em meio ácido.

A imunofixação é realizada em quatro etapas: separação das proteínas por eletroforese em gel de agarose; fixação e imunoprecipitação das proteínas separadas por eletroforese, aplicação do fixador e dos antissoros diretamente sobre o gel, ao nível das pistas de migração. Os anticorpos difundem-se no gel, o fixador precipita as proteínas e os anticorpos precipitam os antígenos correspondentes; as proteínas solúveis, não precipitadas, são removidas do gel por lavagem e absorção com papel de filtro. As proteínas precipitadas ficam retidas no interior do gel; coloração das proteínas e comparação da posição das bandas imunoprecipitadas com as bandas anómalas observadas após a eletroforese das proteínas (Morrison *et al*, 2019).

Em Anexo é possível observar os principais passos envolvidos na realização da imunofixação com o kit Hydragel IF K20 Standard Mask do fornecedor Sebia.

A imunosubtração ou imunofixação por capilaridade é um método em que cinco alíquotas de amostras de soro são pré-incubadas com antissoros humanos IgG, IgA, IgM, kappa ou lambda. Após agregação, a eletroforese por capilaridade é realizada e o eletroforetograma é comparado com o original. Cada imunoglobulina pode ser subtraída à medida que ocorre a migração tendo em atenção os seus tamanhos. A combinação com os anti-soros de cadeia pesada e cadeia leve, levam ao desaparecimento das cadeias que causam o pico monoclonal suspeito, confirmando o seu imunotipo. Apesar de ser uma técnica de fácil interpretação com proteínas monoclonais pesadas, é mais difícil de interpretar, bem como quando ocorre comigração de clones ou com pequenos clones. Uma das principais dificuldades na utilização desta técnica é a dificuldade de interpretação de pequenas bandas como no caso da doença de cadeias leves (Morrison *et al*, 2019).

A imunofixação convencional apresenta uma elevada sensibilidade e continua a ser a técnica mais utilizada para a caracterização e confirmação da existência de monoclonaridade. Esta técnica permite detetar bandas pequenas de 50 mg a 100mg/L no soro e abaixo dos 5 mg/L na urina (Pretorius, 2015).

Para a realização da imunofixação e imuno-eletroforese é recomendada a utilização de soros frescos. As amostras devem ser refrigeradas de 2º a 8ºC, o mais rapidamente possível

após a colheita, para uma conservação até uma semana. Para períodos mais prolongados deve proceder-se à congelação.

5.3 Interpretação de Imunofixação de Proteínas Séricas

Após a realização da imunofixação, referida anteriormente, é importante a interpretação do resultado obtido e são vários os cenários possíveis, como a ausência de bandas monoclonais, e nesta situação a amostra de soro apresenta uma zona corada difusa de imunoglobulinas policlonais em todas as pistas da eletroforese, pista de referencia ou ELP, pista G, A, M, k e λ (ver Fig.13). Trata-se de uma hipergamaglobulinémia com zona difusa, fortemente corada.

A presença de uma banda monoclonal ou imunoglobulina monoclonal é outro cenário possível e é caracterizada por uma banda estreita detetada com um dos antissoros anticadeias pesadas (gama, alfa ou mu) e com um dos antissoros anticadeias leves (k e λ). É uma banda bem visível e definida e deve estar localizada ao mesmo nível de migração que a banda presente na pista de referencia ELP (Morrison *et al*, 2019).

No entanto, existem situações em que há ausência de reação com os antissoros anticadeias pesadas aplicados, mas verifica-se a presença de uma cadeia leve. Isto pode significar a presença de uma gamopatia IgD ou IgE, sendo necessário a realização desta verificação com os respetivos antissoros. A presença de uma banda anticadeias leves sem presença de uma banda anticadeias pesadas pode também ocorrer se se tratar de uma cadeia leve livre, fato que é necessário confirmar com antissoros específicos anticadeias leves livres.

Se apenas aparecer uma banda numa cadeia pesada deve ser confirmada podendo tratar-se de uma situação muito rara associada a doenças das cadeias pesadas.

A presença de duas ou mais bandas monoclonais, estes casos são mais raros, no entanto são situações em que existe proliferação de vários clones de células B, o que se traduz na presença de várias bandas monoclonais observadas na imunofixação. Uma gamopatia biclonal é caracterizada pelo aparecimento de duas bandas de cadeias pesadas, idênticas ou diferentes, e de duas bandas de cadeias leves idênticas ou diferentes. As imunoglobulinas polimerizadas caracterizam-se pela presença de várias bandas sobre uma mesma cadeia pesada e uma mesma cadeia leve. Nestes casos é necessário confirmar esta anomalia monoclonal com uma despolimerização da amostra de soro com beta-mercaptoetanol e repetir a imunofixação. Uma banda oligoclonal também pode surgir na imunofixação e caracteriza-se pela presença de múltiplas bandas de um ou mais tipos de cadeias pesadas e por um ou mais tipos de cadeias leves (Harris & Winter, 2012).

Os resultados da imunofixação nem sempre são fáceis de interpretar, sendo necessário formação para considerar ou não uma banda como monoclonal. Trata-se de uma técnica usada maioritariamente de forma manual sem recorrer a autoanalísadores, pelo que o erro deve ser tido em conta.

A presença de fibrinogénio na amostra de soro, como referido anteriormente, pode influenciar o resultado da eletroforese de proteínas, originando uma fração alterada, que não é confirmada pela imunofixação. Se se verificar a presença de bandas em todas as pistas da imunofixação, então deve suspeitar da presença de crioglobulina ou de uma IgM polimerizada. Deve-se despolimerizar a amostra com agente redutor e repetir a imunofixação (Csako, 2012).

Na sua prática laboratorial a autora realizou esta técnica diversas vezes com a obtenção de resultados bastante satisfatórios. As bandas monoclonais obtidas por imunofixação apresentam-se bem definidas como é possível observar na Fig.13.

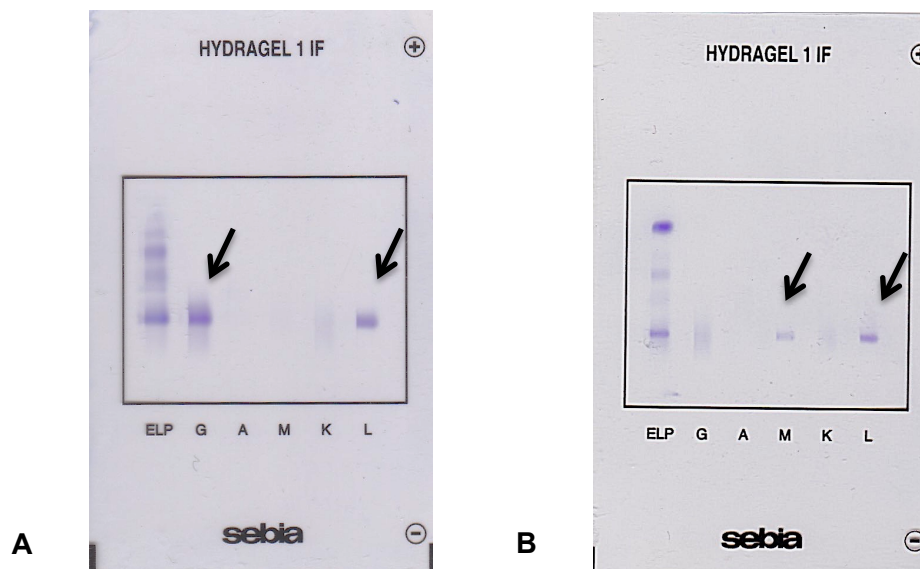


Fig.13- Resultado de imunofixação de dois pacientes com eletroforese de proteínas séricas anormal. A- Presença de banda monoclonal IgG e cadeia lambda. B- Presença de banda monoclonal IgM e cadeia lambda.

Na Fig.13, na imagem A, é possível observar a imunofixação realizada ao soro do paciente com eletroforese de proteínas anormal (Fig.12). O indivíduo apresentava os seguintes valores de imunoglobulinas séricas: IgA=147mg/dL; IgG=1970mg/dL; IgM=93mg/dL em doseamentos de rotina. A proteinúria em urina de 24 horas era elevada e hemoglobina baixa. A informação clínica colhida pelo técnico que realizou a colheita refere anemia prolongada, dores ósseas e cansaço. Com o resultado da imunofixação foi possível auxiliar o médico no diagnóstico de uma gamopatia monoclonal. O indivíduo realizou biopsia medular e ressonância magnética, foi confirmado o diagnóstico de mieloma múltiplo.

Na imagem B da Fig.13 é possível observar o resultado da imunofixação no soro de um outro paciente com 73 anos e do sexo masculino, com a presença de uma banda monoclonal IgM e com banda monoclonal de cadeia leve λ . Na imagem B observa-se que a banda que migra na posição ELP migra em simultâneo na pista M e na pista λ . A existência de uma banda monoclonal IgM é consistente com o diagnóstico de macroglobulinemia

de Waldenström. É uma patologia que pode ser confirmada através da biopsia óssea e tomografia axial computadorizada (TAC) do abdômen e pélvis, não tem tratamento (Ferrerri & Vitolo, 2008).

6. Outros testes utilizados no diagnóstico de Gamopatias

6.1 Eletroforese e Imunofixação Urinárias

A eletroforese de proteínas urinária pode ser altamente informativa quanto ao tipo de proteínas que é excretada, sob condições patológicas. Em circunstâncias normais, uma quantidade muito pequena de proteína é libertada na urina e não reabsorvida. Enquanto a proteína total no plasma tem valores entre as 6 e as 8 g/dL, a concentração de proteína urinária é de apenas 10 a 15 mg/dL. Assim, existe aproximadamente 800 vezes mais proteína no sangue que na urina. Esta concentração de proteína urinária é cerca de 1/3 a 1/4 inferior à registada no líquido cefalorraquidiano que tem concentração de aproximadamente 45 mg/dL (Harris & Winter, 2012).

A proteinúria corresponde à elevação dos valores de proteína na urina, num determinado período de tempo. A forma como é determinada deve ter em consideração que alterações no volume de urina nem sempre indicam um aumento do valor de proteína excretada em 24 horas. A presença de proteína na urina pode ser detetada através de tiras com reagente que são mergulhadas na urina e após algum tempo obtêm-se uma leitura de presença/ausência e no caso de presença é realizada uma quantificação (+, ++, +++). Este método é mais sensível para a deteção de albumina na urina, que é a mais abundante, e não tanto para a deteção de pequenas proteínas de baixo peso molecular como as imunoglobulinas. A concentração de proteínas urinárias é mais corretamente determinada através do rácio entre a concentração das proteínas e a concentração de creatinina urinária ou por colheita de urina de 24 horas preferencialmente, e determinação da proteína excretada por unidade de tempo. As proteínas totais em urina de 24 horas permitem obter informação viável quanto à quantidade real de proteína excretada. No entanto, os pacientes devem ser corretamente instruídos para a colheita deste produto biológico, mais uma vez a fase pré analítica pode influenciar todo o processo. A urina deve ser colhida rejeitando a primeira micção da manhã, do dia em que inicia a colheita, e registando a hora, e de seguida colher toda a urina até ao dia seguinte terminando à mesma hora da primeira micção do dia anterior. Esta última micção deve ser colhida para perfazer as 24 horas. Não usar conservantes e a amostra deve ser refrigerada durante a colheita (Harris & Winter, 2012).

Como referido anteriormente, a proteína urinária mais abundante é a albumina mas quando existe doença glomerular aparece a transferrina. Na eletroforese de proteínas urinárias a proteinúria glomerular é reconhecida como um pico de beta globulinas, onde a transferrina está localizada, e um pico maior de albumina, e pode apresentar diferentes casos de severidade.

A proteinúria tubular é também detetável na eletroforese de proteínas urinárias devido à presença de uma banda dupla na região da alfa 2, composta por isoformas da alfa 2 microglobulina. Esta doença apresenta uma severidade que varia de indivíduo para indivíduo, tendo em atenção o evoluir da proteinúria. Uma situação de proteinúria tubular severa é detetada quando para além das duas bandas na zona de alfa 2 está presente um pico da zona da beta.

A eletroforese urinária pode indicar seletividade tubular, glomerular ou tubular/glomerular. Ainda pode indicar características inflamatórias ou uma banda de mobilidade restrita que deve ser posteriormente estudada por imunofixação.

A eletroforese urinária fornece informação importante no que respeita a doenças renais e sistémicas. É uma técnica de alta resolução, muito eficiente na resposta à identificação de onde provém a proteinúria. A presença de imunoglobulinas monoclonais e a extensão da sua excreção na urina é uma informação valiosa na avaliação de gamopatias monoclonais (Harris & Winter, 2012).

A imunofixação urinária vem confirmar os picos suspeitos de um componente monoclonal na eletroforese urinária como é possível observar na Fig.14. Apesar da hemólise poder produzir um pico parecido com um componente M, este facto é facilmente avaliado na imunofixação urinária.

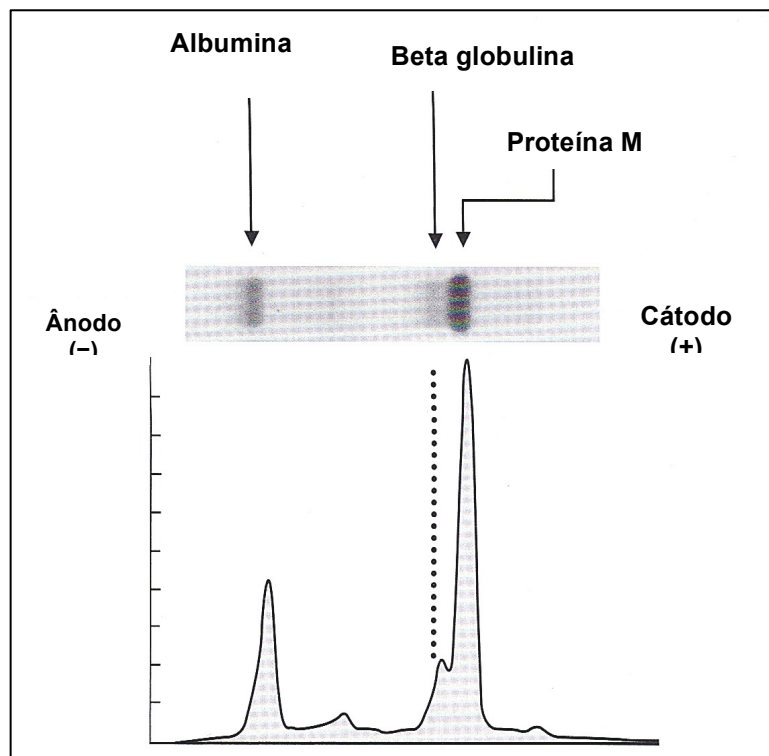


Fig.14 Eletroforese urinária com a presença da banda de albumina, de uma banda de beta globulinas e uma banda de mobilidade restrita, possível pico M. Neste caso deve ser realizada uma imunofixação urinária para confirmar e classificar a existência de banda monoclonal (Adaptado de Harris & Winter, 2012).

A combinação de eletroforese de proteínas séricas e urinárias juntamente com a realização da imunofixação vem aumentar significativamente as probabilidades de detecção de um mieloma múltiplo (Morrison *et al*, 2019).

A urina de eleição para a realização de imunofixação é a urina de 24 horas, apesar de poder ser realizada na urina da manhã, ou urina aleatória onde a sensibilidade pode ser mais reduzida.

As cadeias leves livres são filtradas pelo glomérulo renal e são detetadas na urina por imunofixação se em quantidade suficiente. O objetivo da imunofixação é a detecção de cadeias leves livres, ou seja, proteína de Bence Jones. Para maximizar a sensibilidade desta técnica podem ser usadas várias combinações de antissoros: antissoros para identificar uma cadeia pesada IgA, IgG ou IgM em particular, antissoros combinados IgG/A/M, anti-soro de ligação para kappa e lambda livres e antissoros só para lambda livre ou para kappa livre. Os resultados mais comuns incluem a detecção de uma banda monoclonal kappa ou lambda livres que é indicador de mieloma múltiplo, podendo ser decisiva na confirmação do diagnóstico (Morrison *et al*, 2019).

A detecção de uma cadeia monoclonal pesada e de uma cadeia monoclonal leve intactas podem ser indicadores de mieloma múltiplo e também falha renal.

6.2 Proteína de Bence Jones

A proteína de Bence Jones é uma análise relevante quando se investiga uma possível gamopatia monoclonal ou quando existem resultados comprovados no sangue da existência de uma componente monoclonal. A detecção da proteína urinária de Bence Jones é relevante no diagnóstico do mieloma múltiplo. Está presente em 14 a 20 % dos casos como único componente monoclonal e em 75% dos pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo (Mussap *et al*, 2006).

A proteína de Bence Jones é uma imunoglobulina monoclonal de cadeia leve excretada na urina que precipita a 60°C e dissolve a 75°C (Morrison *et al*, 2019).

Os estudos realizados têm evidenciado que a sua presença pode ser preditiva de gamopatia monoclonal com malignidade, apesar de ocasionalmente aparecer em indivíduos com gamopatia monoclonal de significado indeterminado com valores de até um 1g/24h (Beetham, 2000).

A sua importância também está relacionada com o prognóstico e com o direcionar de indivíduos com um diagnóstico inicial incerto. A detecção desta proteína urinária e a formação de depósitos de agregados de cadeias leves monoclonais pode apontar para uma amiloidose AL ou doença de deposição de cadeias leves, que permitirá um tratamento mais atempado destas patologias (Mussap *et al*, 2006).

Apesar da detecção da proteína de Bence Jones possa ser efetuada no laboratório com um simples teste de calor, apresenta limitações. No que respeita ao mieloma múltiplo esta técnica apresenta elevada especificidade, mas baixa sensibilidade. Alguns investigadores referem que o teste do calor pode apresentar falsos positivos, quando existe um excesso de proteínas policlonais na amostra. Assim, é recomendada a utilização de eletroforese e imunofixação urinária para uma detecção mais eficiente da proteína de Bence Jones (Tomaz *et al*, 2017).

6.3 Doseamento de cadeias leves livres

As imunoglobulinas intactas, como referido anteriormente, são compostas por duas cadeias pesadas (IgA, IgG, IgM) e duas cadeias leves (kappa e lambda) ligadas por pontes dissulfeto. A síntese das imunoglobulinas resulta de recombinações aleatórias, originando uma variabilidade funcional. No entanto, apesar desta variabilidade ser excelente para a função imunitária, é um fenómeno que permite obter um produto final muito heterogéneo. Esta heterogeneidade vem complicar a análise laboratorial ou seja as imunoglobulinas não são todas idênticas. A degradação destas imunoglobulinas nos seus péptidos pode ocorrer com as cadeias leves kappa e com as cadeias lambda. Mas, apesar de o rim conseguir processar 10-30g de cadeias leves por 24 horas, a acumulação destas cadeias tem um significado clínico pois podem levar a disfunção renal.

Os pacientes com dores e fraturas ósseas com proteína na urina, que precipita a 60°C e dissolve a 75°C foram descritos pelo Dr. Bence Jones em 1847, mas apenas em 2001 foi possível obter um método que diferenciasse as proteínas de cadeias leves livres das cadeias leves totais.

Os métodos turbidiméticos são utilizados para medição das cadeias leves livres, recorrendo à aplicação de anticorpos policlonais de cadeias leves kappa e lambda específicos livres das cadeias pesadas. Para superar a heterogeneidade foram desenvolvidos métodos alternativos, como a nefelometria, que usa anticorpos monoclonais e policlonais baseados na técnica de ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent Assay).

A determinação das cadeias leves livres e do seu rácio são de elevada importância para a avaliação do estado renal, a diminuição da função renal pode levar ao aumento da cadeia leve livre kappa e assim levar ao aumento do rácio kappa/lambda (Morrison *et al*, 2019).

Parte V

As gamopatias são patologias que se caracterizam pela anormal distribuição e/ou concentração das imunoglobulinas plasmáticas. As três principais classes de imunoglobulinas, IgG, IgA e IgM podem ser quantificadas com a utilização de métodos turbidimétricos e nefelometria. Alternativamente a área em percentagem na eletroforese de proteínas, pode ser utilizada, multiplicando pelas proteínas totais do soro para obter a concentração das gamaglobulinas (Harris & Winter, 2012).

As gamopatias podem ser monoclonais com a presença de uma paraproteína denominada pico-M, ou policlonais com diferentes classes de imunoglobulinas aumentadas e com a região das gamaglobulinas aumentada, no gráfico da eletroforese das proteínas. A monoclonalidade é detetada no soro ou na urina por imunofixação e/ou por um rácio das cadeias leves livres kappa/lambda anormal. A sua interpretação e análise deve ter em conta falhas e interferências como em qualquer método analítico (Harris & Winter, 2012).

As gamopatias monoclonais podem ser IgA, IgG, IgM, IgD ou IgE (com cadeia leve kappa ou lambda), cadeias pesadas gama, mu, alfa, cadeias leves livres kappa, cadeias leves livres lambda, ou essencialmente qualquer combinação de classes de imunoglobulinas, cadeias leves ou pesadas.

As gamopatias biclonais e triclonais podem ocorrer, no entanto pouco se conhece da sua origem. Pensa-se que não deve ser diferente do que acontece no caso monoclonal.

Os autores Kyle & Rajkumar (2006), num estudo realizado com pacientes da Mayo Clinic concluíram que a distribuição das patologias associada a um pico M na eletroforese de proteínas séricas é de 51% de indivíduos com gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), 18% apresentam múltiplo mieloma com sintomatologia, 11% com amiloidose, 4% apresenta doenças linfoproliferativas como por exemplo, leucemia linfocítica crónica e linfoma linfoplasmocítico e 16% apresentam outros diagnósticos como plasmocitoma ou mieloma latente.

Harris & Winter (2012) classificam as patologias que podem causar as gamopatias monoclonais em gamopatias monoclonais benignas, neoplásicas, discrasias neoplásicas dos plasmócitos e gamopatias monoclonais por deposição.

1. Gamopatias Monoclonais Benignas

1.1 Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI)

As gamopatias monoclonais estão associadas à proliferação monoclonal de plasmócitos e caracterizam-se pela existência de uma imunoglobulina clonal (paraproteína M) no soro e/ou urina (Parreira *et al*, 2014).

Uma gamopatia monoclonal só é considerada gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) quando o pico monoclonal no sangue periférico é inferior a 3g/dL, a proteína de Bence Jones na urina de 24 horas é inferior a 0.5 g/dL e a proliferação de células medulares clonais inferior a 10% (Atkin *et al*, 2018).

Ainda existem outros critérios de eliminação como a ausência de envolvimento de um órgão alvo como o rim, os ossos ou a medula (Parreira *et al*, 2014).

A GMSI é considerado um estágio precursor na evolução para mieloma múltiplo. Ao ser detetada uma paraproteína monoclonal deve ser eliminada a existência de uma patologia hematológica, de acordo com Atkin *et al* (2018).

A incidência deste tipo de gamopatia surge em cerca de 3% dos indivíduos com mais de 50 anos e em indivíduos com idade superior a 70 anos ultrapassa os 5% (Kyle & Rajkumar, 2006).

A GMSI tem um risco de evolução para mieloma múltiplo de 1% ao ano, pelo que é necessária uma vigilância regular de indivíduos a quem se deteta o pico monoclonal, de forma a antecipar a progressão para doença sintomática. Assim, pretende-se evitar potenciais complicações resultantes da lesão de órgãos alvo (Atkin *et al*, 2018).

Rajkumar *et al* (2014), refere que o risco de progressão de uma gamopatia monoclonal de significado indeterminado depende da concentração de proteína monoclonal, do tipo de proteína monoclonal, do rácio de cadeias leves livres no soro, da plasmócitose na medula óssea, da proporção fenotípica dos clones de células do plasma e da presença de imunoparesia.

De acordo com Parreira *et al* (2014), as GMSI dividem-se em dois grupos: as linfóides e as plasmáticas. As plasmáticas subdividem-se em 3 grupos: as GMSI não IgM, que constituem o subtipo mais frequente (IgG, IgA, IgD), podem progredir para mieloma múltiplo indolente/latente, sintomático, amiloidose, doença de deposição de cadeias leves ou outra doença linfoproliferativa. As GMSI IgM, representam cerca de 15% dos casos, com um risco de progressão para macroglobulinemia de Waldenström e mais raramente mieloma múltiplo ou amiloidose. Por fim, o último subgrupo é o das GMSI de cadeias leves é um subgrupo mais raro com risco potencial de progressão para mieloma múltiplo de cadeias leves, amiloidose ou doença de cadeias leves livres.

A GMSI é maioritariamente detetada aquando de acompanhamento clínico de indivíduos com outras comorbilidades. A taxa de GMSI varia com a etnia, de acordo com a maioria dos estudos realizados tem uma prevalência três vezes superior em indivíduos afrodescendentes, que em caucasianos. As razões para o seu aparecimento podem estar associadas a modificações citogenéticas e/ou a microalterações na medula óssea. As translocações cromossómicas são comuns e ocorrem em regiões responsáveis pela codificação das cadeias pesadas das imunoglobulinas. A translocação mais comuns é t(11;14) (q13;q32), que corresponde à translocação entre o locus para cadeia pesada do cromossoma 14 e o gene que codifica a Ciclina D1 no cromossoma 11, e que foi demonstrada em 25% dos pacientes com GMSI. A desregulação da proteína Ciclina D foi

observada quer em paciente com GMSI como em pacientes diagnosticados com Mieloma Múltiplo (Atkin *et al*, 2018).

A GMSI é assintomática mas ao evoluir tem associada complicações como a existência de fraturas, osteoporose, infecção, doença renal neuropatia e trombose, pelo que, qualquer indivíduo que tenha sido diagnosticado deve ser seguido por especialistas e realizar monitorização anual. A evolução para mieloma múltiplo é imprevisível devendo ter em consideração os casos com maior risco que apresentam níveis de proteína monoclonal superior a 15 g/L, após o primeiro ano de diagnóstico, e um subtipo de proteína monoclonal não IgG mas sim IgA ou IgM (Atkin *et al*, 2018).

Harris & Winter (2012) referem que aproximadamente 70% das gamopatias monoclonais de significado indeterminado originam um clone IgG, 12% exibem clone IgA, 15% origina clone IgM e ainda 3% de GMSI exibem clone biclonal.

O diagnóstico de GMSI não faz parte dos teste de rotina, sendo apenas realizados testes quando existe suspeita, no entanto, o diagnóstico precoce vem melhorar significativamente a qualidade de vida do indivíduo porque permite mitigar o impacto negativo das complicações de uma gamopatia de significado indeterminado que muito provavelmente evoluirá para mieloma.

1.2 Inflamações e Infecções Crónicas

As inflamações crónicas como a artrite reumatoide, o escleroderma, e a tiroidite de Hashimoto são patologias não neoplásicas que podem provocar um pico M na eletroforese. Em infecções como endocardites bacterianas ou infecções por *Mycobacterium tuberculosis* é também possível observar eletroforese com este tipo de pico na região gama (Harris & Winter, 2012).

Os indivíduos com gamopatia monoclonal são susceptíveis a infecções bacterianas recorrentes, em que as mais comuns são as pneumonias e piélonefrites, e os agentes mais frequentes são *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* nos pulmões e *Escherichia coli* e outros gram negativos no trato urinário. A razão para esta susceptibilidade tem várias causas. Os indivíduos com mieloma apresentam uma hipogamaglobulinémia difusa, se excluir a componente M. A hipogamaglobulinémia está relacionada quer com a diminuição da produção, quer com o aumento da destruição dos anticorpos normais. Alguns pacientes ainda produzem uma população de células reguladoras em circulação em resposta ao mieloma que podem suprimir a síntese de anticorpos normais. No caso de um mieloma IgG os anticorpos normais IgG são degradados mais rapidamente que o normal, uma vez que a sua taxa catabólica de anticorpos IgG, varia diretamente com a concentração do soro. Nestes pacientes a resposta dos anticorpos é muito fraca, especialmente quando presentes a um antígeno polissacarídeo, como o que está presente na parede celular bacteriana. As funções do complemento também

apresentam anormalidade, pelo que, todos estes factos contribuem para uma resposta imune deficiente.

1.3 Imunossupressão devido a transplantação

A utilização de tratamentos com base em imunoglobulinas monoclonais pode trazer algumas dúvidas na interpretação do proteinograma eletroforético, sendo considerado um factor de interferência (*Morrison et al*, 2019).

2. Gamopatias Monoclonais Neoplásicas

2.1 Discrasias Neoplásicas dos Plasmócitos

2.1.1 Mieloma Múltiplo Latente

O mieloma múltiplo latente é um estágio intermédio da patologia mieloma múltiplo, entre uma gamopatia monoclonal de significado indeterminado e um mieloma múltiplo ativo. Nesta fase o risco de progressão da doença nos primeiros 5 anos após diagnóstico é de 10%. A sua definição compreende uma imunoglobulina monoclonal com concentração inferior a 30 g/L ou uma concentração urinária de imunoglobulina monoclonal inferior a 500 mg/24h. Nesta fase não são reportados danos graves em órgãos internos, o que não é muito diferente do que acontece com a gamopatia monoclonal de significado indeterminado. O que os distingue é a presença de clones de plasmócitos na medula óssea com percentagens de 10% a 60% (*Morrison et al*, 2019).

De acordo com Radjkumar *et al* (2014), o mieloma múltiplo ativo não requer uma concentração mínima de imunoglobulina monoclonal. Estes autores vêm incluir 3% de pacientes com mieloma cujas células neoplásicas não segregam imunoglobulinas. Adicionalmente cerca de 40 % de pacientes com mieloma apresentam lesões nos órgãos, mas valores de imunoglobulinas inferiores a 30 g/L na altura do diagnóstico. A diferença entre o mieloma latente e o mieloma ativo prende-se com a presença ou ausência de um conjunto de critérios como a evidência de lesão nos órgãos internos, atribuída a hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas; biomarcadores de malignidade como a presença de uma percentagem igual ou superior a 60% de células clonais na medula; concentração de cadeias leves livres igual ou superior a 100mg/L; resultado da ressonância magnética com mais do que um local de lesão. Com estes critérios de atuação pretende-se identificar pacientes com mieloma múltiplo latente sem que estes apresentem um grau de comprometimento, nos órgãos internos, mas com um elevado risco de progressão para um mieloma múltiplo ativo. Os estudos realizados têm demonstrado que

com um valor de cadeias leves livres igual ou superior a 100, a probabilidade de progressão para mieloma em dois anos é de 80% (Larsen *et al*, 2013).

A detecção precoce desta patologia neoplásica permite iniciar a terapêutica indicada e os pacientes acabam por beneficiar no entanto, falta desenvolver um biomarcador que possibilite distinguir os indivíduos com mieloma múltiplo latente e indivíduos com pré-malignidade (Rajkumar *et al*, 2014).

Morrison *et al* (2019), refere que cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com mieloma sobrevivem em média 5 anos.

2.1.2 Mieloma Múltiplo

O mieloma múltiplo é conhecido por diferentes nomes incluindo mieloma das células do plasma, mielomatose, plasmocitoma medular ou doença de Kahler. É uma patologia definida por uma proliferação citogenética e heterogênea de clones de células plasmáticas (Rajkumar *et al*, 2014).

O mieloma múltiplo é uma patologia com uma longa história, pensa-se que os primeiros registados terão ocorrido em 1844. O médico S. Solly realizou autópsias a estes indivíduos e foi possível verificar que a medula óssea parecia que tinha sido substituída por uma substância avermelhada, inicialmente considerou tratar-se de um processo inflamatório em que a matriz óssea seria absorvida e excretada pela urina através do rim (Kyle & Rajkumar, 2008).

O mieloma múltiplo surge na maioria dos indivíduos por progressão de um estado de gamopatia monoclonal assintomática, que com o tempo progride para um mieloma múltiplo ativo, sintomático. O mieloma múltiplo representa uma proliferação maligna incontrolável dos plasmócitos. Esta anomalia, juntamente com a resposta imunitária do indivíduo provocam disfunções em diferentes órgãos e sintomas desde dores nos ossos, insuficiência renal, suscetibilidade para infeções, anemia, hipercalcemia e ocasionalmente ocorrem interferências nos fatores de coagulação, sintomas neurológicos e hiperviscosidade (Wilson *et al*, 1991).

O mieloma ativo representa cerca de 10% dos cancros hematológicos e também mais comum em afrodescendentes que em caucasianos, o dobro, e ligeiramente mais comum no sexo masculino que no feminino (Kyle & Rajkumar, 2008).

O mieloma foi diagnosticado a indivíduos expostos a radiação nuclear durante a Segunda Guerra Mundial, após um período de latência de 20 anos. Apesar de não existir uma evidência direta de oncogenes no mieloma humano, a observação de oncogenes *c-myc* e *b-lym* no linfoma de Burkitt's, a elevada incidência de translocações cromossomais em tumores de células-B, e o papel dos vírus RNA em plasmocitoma murino sugerem que as células de linhagem B podem ser suscetíveis e um crescimento desregulado por este tipo de estímulo radioativo. No plasmocitoma murino é possível obter evidências que a indução do plasmocitoma requer um tipo de exposição a antígenos externos. Este facto sugere que um

estímulo antigénico pode desempenhar um papel importante na transformação de um determinado tipo de clone de células B. Existe também uma predisposição genética para o aparecimento desta patologia em humanos. Estudos realizados por Wilson *et al*, (1991) demonstram que pacientes com mieloma apresentam o HLA-B5 expresso mais frequentemente que em outros pacientes. Existe a possibilidade de que o evento neoplásico, possa envolver as células iniciais da formação das células B (Wilson *et al*, 1991).

Esta patologia apresenta como manifestações clínicas a dor nos ossos, que é a mais comum e está presente em 70 % dos casos. A dor referida pelos pacientes ocorre geralmente nas costas e costelas aumentando com o movimento, quando persistente e localizada, num paciente com mieloma, geralmente está associada a uma fratura. As lesões ósseas no mieloma são devidas à proliferação das células tumorais e pela ativação dos osteoclastos, que destroem o osso. O aumento da destruição do osso vem por sua vez aumentar a libertação de cálcio do osso para a corrente sanguínea, hipercalcemia, é responsável por complicações agudas e crónicas. Podem verificar-se lesões no crânio, clavículas e esterno e ainda compressão de medula espinal (Harry & Winter, 2012).

O segundo problema clínico mais comum em pacientes com mieloma é a suscetibilidade a infeções bacterianas.

A insuficiência renal acontece em cerca de 25% dos pacientes com mieloma. A hipercalcemia é um dos principais fatores de insuficiência renal. Os depósitos glomerulares de amiloide, hiperuricemia, infeções recorrentes e infiltrações de células do mieloma no rim são as principais causas da disfunção renal. As lesões tubulares que ocorrem devido à libertação de proteínas, mais precisamente cadeias leves livres também se verificam e são causa de insuficiência renal (Wilson *et al*, 1991).

As cadeias leves livres podem levar à doença renal evidenciada por um aumento da creatinina no soro e pelo declínio da taxa de filtração glomerular. A elevação da creatinina está presente em 20 a 30% dos casos de mieloma múltiplo. O valor de ácido úrico aumentado no soro pode também ocorrer devido à fraca excreção, uma vez que a taxa de filtração glomerular diminui. A doença renal pode acontecer quando as cadeias leves que são filtradas ao nível do glomérulo provocam danos nos túbulos proximais, uma vez que a sua capacidade de reabsorção é excedida e as cadeias leves depositam-se. Estes depósitos são responsáveis por danos como a rutura e consequentemente as nefrites intersticiais, causando danos no rim (Harris & Winter, 2012).

A anemia ocorre em cerca de 67% dos indivíduos com mieloma, é normalmente normocítica e normocrómica. Esta patologia surge devido ao aumento de células do mieloma na medula óssea e devido à inibição da hematopoiese por fatores produzidos pelas células anormais. É também registada leucopenia e trombocitopenia. As anomalias nos fatores de coagulação podem ocorrer por falha de funcionamento dos anticorpos antiplaquetários ou por intervenção do componente M nos fatores I, II, V, VII ou VIII. Os sintomas neurológicos ocorrerem em poucos pacientes mas, não devem ser descurados. A hipercalcemia provoca letargia, fraqueza, depressão e confusão. A hiperviscosidade pode

desencadear dores de cabeça, fadiga, distúrbios visuais e retinopatia. A perda de controle urinário, a compressão da medula óssea, a dor radicular e a síndrome do túnel cárpico podem também ocorrer nos pacientes com mieloma múltiplo (Rajkumar *et al*, 2014).

Uma das maiores dificuldades no diagnóstico desta patologia, que é diferente de outras malignidades, é que se trata de uma doença com uma definição clinicopatológica, ou seja, é necessário que ocorram manifestações clínicas sérias como danos em órgãos, como por exemplo, falha renal ou lesões osteolíticas para que o diagnóstico seja reportado como mieloma múltiplo. Este dilema fazia com que os pacientes não recebessem atempadamente tratamento que preveniria a falha de órgãos ou qualquer outro tratamento contra o cancro, num estágio precoce, quando se encontra mais suscetível. Esta forma de agir era aceite porque os tratamentos que existiam eram muito restritos e os efeitos tóxicos bastante nefastos para o indivíduo e aparentemente os benefícios clínicos numa intervenção atempada não eram significativos. Atualmente esta justificação não é aceitável, uma vez que as opções de tratamento aumentaram e demonstram que uma atuação inicial em pacientes assintomáticos pode prolongar a esperança de vida (Rajkumar *et al*, 2014).

O avanço no desenvolvimento em técnicas laboratoriais e em imagiologia vêm melhorar a avaliação dos critérios que definem um paciente em risco de contrair mieloma múltiplo.

2.1.3 Plasmocitoma

A maioria das neoplasias das células plasmocíticas ocorre em diversos locais da medula óssea, contudo existe um tipo de tumor solitário composto por células monotípicas que pode ocorrer num osso, ou mesmo no exterior do osso (plasmocitoma extra ósseo). O plasmocitoma ósseo e o plasmocitoma extra ósseo representam cerca de 3 a 5% cada de todas as células neoplásicas (Harris & Winter, 2012).

O plasmocitoma não causa sintomas ou sinais típicos do mieloma múltiplo como anemia, cálcio elevado ou lesões ósseas porque a medula óssea não está extensivamente envolvido pelo plasmócitoma. No diagnóstico desta patologia é sempre necessário a realização de ressonância magnética para excluir lesões ósseas em múltiplos locais, que é algo que se verifica no mieloma múltiplo mas não no plasmocitoma. Contudo, no plasmocitoma ósseo pode ocorrer destruição local do osso, num único local. Nesta patologia desconhece-se a razão pela qual não se registam sintomas de doença renal. No plasmocitoma ósseo um único local ósseo é afetado, onde a hematopoiese ocorre normalmente como nas vértebras, crânio, pélvis, fémur, clavícula ou escápula. Em cerca de 25% a 75% dos casos é reportado um pico M em eletroforese (Harris & Winter, 2012).

No plasmocitoma extra ósseo o osso não sofre danos e os locais mais comuns são o trato respiratório superior como a laringe, orofaringe, faringe e seios perinasais, mas outros locais como o trato gastrointestinal, nódulos linfáticos e a bexiga também podem ser

afetados. Nestes casos um pequeno pico M, maioritariamente IgA, é reportado em cerca de 20 % dos casos (Harris & Winter, 2012).

Rajkumar *et al* (2014), refere que para diagnóstico de plasmocitoma é necessário biopsia da lesão óssea ou tecido envolvente, com evidências de clones de células, ausência de insuficiência renal, anemia, hipercalcemia, lesões ósseas. A ressonância magnética deve apresentar-se normal na superfície do esqueleto, pélvis e coluna, com a exceção da zona de lesão solitária. A taxa de progressão para mieloma múltiplo pode ser de 60% em indivíduos com plasmocitoma ósseo e de 20% em indivíduos com plasmocitoma dos tecidos moles, em apenas 3 anos.

3. Gamopatias Monoclonais por Deposição

3.1 Amiloidose

A designação de Amiloidose é usada para um grupo de patologias pouco comuns que resultam da deposição extracelular de fibrilas com um diâmetro entre 8-12 nm. Cerca de 95% da massa de fibrilas tem origem em proteínas amiloidogénicas e 5% da massa apresenta várias glicoproteínas como, amiloide-P sérica, laminina, colagénio tipo IV e sulfato de heparina, e ainda por apolipoproteína E. A este conglomerado fibrilado foi dado o nome de amiloide (Harris & Winter, 2012).

A Amiloidose pode ser considerada como uma patologia de dobramento anormal das proteínas. As formações amiloides podem ter origem em proteínas normais ou numa mutação de proteína extracelular ou via macrófagos. A presença ou a expressão de uma proteína amiloidogénica por si só não indica necessariamente que a doença irá ocorrer. As formações amiloides causam disfunção celular por atrofia ou mesmo por danos na própria célula.

Inicialmente, a doença foi classificada como primária, quando a causa do seu aparecimento não era conhecida e secundária quando era conhecida. Com os avanços das técnicas de Imunologia foi possível verificar que a maioria dos casos de amiloidose primária resultavam de uma gamopatia monoclonal produzida por uma cadeia leve (Harris & Winter 2012).

Harris & Winter (2012) consideram que a terminologia de amiloidose primária e secundária é arcaica e deve ser evitada, e é mais importante tentar compreender o contexto em que uma proteína específica provoca amiloidose. A nomenclatura para a patologia considera a letra A para Amiloidose e quando a doença resulta do depósito de uma cadeia leve é designada de AL. As aminoidoses podem ser provocadas por mutações nas proteínas, como a apolipoproteína A e a designação da amiloidose passa a ser A Apo-AI.

As Amiloidoses podem afetar múltiplos órgão, amiloidose sistémica, ou pode predominar num local e apenas afetar um único órgão. No caso de se tratar de uma

patologia sistêmica verifica-se que o conglomerado amiloide forma-se junto aos tecidos por deposição de proteínas de circulação. Estas proteínas podem ser proteínas normais em elevadas concentrações, como acontece na amiloidose inflamatória com excesso de amiloide A sérica, ou com mutação de proteínas hereditárias, como acontece com muitas outras amiloidoses familiares (Wechalekar *et al*, 2015).

As amiloidoses são um grupo raro de doenças em que o depósito de conglomerados de fibrilas provenientes de diferentes tipos de proteínas normais, ou por hereditariedade de uma proteína anormal amiloide, juntamente com o fator do envelhecimento surgem numa fase tardia do ser humano. Estão identificadas mais de 30 proteínas responsáveis por formações amiloides, mas estudos recentes, utilizando espectrometria de massa, demonstram que podem ser mais as proteínas amiloidogénicas. O tipo de amiloidose mais frequente nos países desenvolvidos é a amiloidose AL (Wechalekar *et al*, 2015).

A amiloidose AL é uma doença sistêmica que afecta múltiplos órgãos com uma taxa de sobrevivência de pacientes ainda pouco satisfatória. A gamopatia monoclonal de cadeia leve kappa ou lambda ou os seus fragmentos formam conglomerados de fibrilas que se acumulam e depositam em diferentes tecidos. A doença é provocada pela proliferação de clones de células da medula óssea que segregam uma imunoglobulina de cadeia leve instável, amiloidogénica. A probabilidade de ocorrer aumenta significativamente com a idade, e as pessoas com idade superior a 65 anos são as que apresentam maior risco. Esta é a forma de amiloidose sistêmica mais comum e mais severa. Os depósitos amiloides infiltram-se nos tecidos, levando à sua disfunção ou mesmo à sua destruição. Os órgãos mais afetados são os rins (74%), o coração (60%), o trato gastrointestinal (10-20%), o fígado (27%) e sistema nervoso (18%) (Ryšavá, 2018).

Foi demonstrado por Ryšavá (2018), que no momento do diagnóstico 69% dos indivíduos apresentam lesões em mais do que um órgão. Quando o órgão afetado é o coração o prognóstico da amiloidose pode ser determinante e a causa de morte se não houver uma intervenção atempada e uma boa resposta à terapêutica. A incidência desta doença, amiloidose (AL), é de aproximadamente 10 pessoas por milhão de indivíduos por anos. A insuficiência renal é muito frequente em indivíduos com amiloidose AL e pode levar ao aparecimento de síndrome nefrótica e à falha renal. Num estado mais avançado da doença ocorre destruição dos tecidos.

Com os avanços nos tratamentos, torna-se evidente que um diagnóstico atempado e correto quanto ao tipo de amiloidose é essencial para um tratamento mais eficaz.

Atualmente, técnicas histológicas podem ser usadas para distinguir os depósitos amiloides nos tecidos e técnicas como a imunofluorescência e espectrometria de massa podem ser usadas em casos de dúvida num diagnóstico (Ryšavá, 2018).

A atividade da doença e a resposta hematológica ao tratamento pode ser monitorizada medindo os níveis de proteína monoclonal no soro e na urina. A eletroforese de proteínas séricas é considerada uma técnica inadequada, uma vez que cerca de metade dos indivíduos com amiloidose AL não apresentam um pico monoclonal detetável no soro.

No entanto, considera-se que todos os indivíduos devem ser testados por imunoeletroforese e imunofixação no soro, uma vez que são técnicas mais sensíveis com detecção de níveis de picos M de cerca de 150mg/L e permite uma caracterização de isótopos. Contudo, são técnicas trabalhosas e intensivas que nem sempre permitem obter o resultado pretendido e torna-se necessário recorrer a outras técnicas como ensaios nefelométricos (Ryšavá, 2018).

A amiloidose AL é o tipo de amiloidose mais comum com um prognóstico pouco satisfatório, continua ser uma doença severa e quanto mais cedo for feito o diagnóstico, mais direcionado e agressivo pode ser o tratamento, o que pode levar a uma completa remissão e uma resposta muito positiva dos órgãos afetados. Os novos tratamentos que têm vindo a surgir incluem terapêuticas hematológicas e imunoterapias, e representam uma resposta promissora e uma esperança para esta patologia inicialmente incurável.

3.2 Deposição de cadeias leves

A doença de deposição de cadeias leves (LCDD) é provocada por deposição de cadeias leves provenientes da discrasia de plasmócitos e ocorre ao nível dos tecidos, no entanto, não apresenta forma amiloide. As gamopatias monoclonais kappa provocam mais frequentemente LCDD (cerca de 80%) que amiloidose renal.

Os órgãos mais afetados por esta patologia são os rins, coração, nervos, vasos sanguíneos, e de uma forma menos comum as articulações. Nesta patologia os rins são os órgãos que comumente são mais afetados, pode surgir síndrome nefrótica e em casos mais graves a insuficiência renal com falha do órgão.

No que respeita ao diagnóstico, a proteinúria observada é de 1000-3000 mg/dia e a avaliação é similar à que se realiza quando ocorre suspeita de amiloidose AL, imunofixação, sérica e urinária, e imunofixação com cadeias leves livres kappa e lambda, quando a eletroforese de proteínas séricas e urinárias é negativa (Harris & Winter, 2012).

3.3 Deposição de cadeias pesadas

A doença de deposição de cadeias pesadas (HCDD) é uma forma rara de doença por deposição de imunoglobulinas monoclonais. Esta patologia é definida pela presença de depósitos nos tecidos de imunoglobulinas monoclonais de cadeias pesadas truncadas, mais frequentemente com uma cadeia pesada de uma imunoglobulina IgG (IgG; γ -HCDD) e ocasionalmente IgA (α -HCDD), IgM (μ -HCDD), ou IgD (δ -HCDD). As manifestações clínicas incluem hipertensão, perda progressiva da função do rim, anemia, proteinúria e hematúria (Zhang *et al*, 2019).

Cohen *et al*, (2015), descreve a combinação do depósito de cadeia leves e cadeia pesadas normais, especialmente no rim.

4. Linfomas e Leucemias

4.1 Macroglobulinémia de Waldenström

A Macroglobulinémia de Waldenström é uma patologia também provocada por uma gamopatia monoclonal, trata-se de um subgrupo raro de linfomas de células B indolente e é definido por uma imunoglobulina IgM no soro obtido utilizando técnicas de eletroforese de proteínas e posteriormente imunofixação, e pela presença de 10 % de células linfoplasmócíticas na medula óssea por estudos histológicos.

Os autores Grunengerg & Buske (2017) referem que esta patologia representa 1-2% de todas as neoplasias hematológicas e tem uma incidência anual de 3.8 por milhão de indivíduos nos Estados Unidos.

A Macroglobulinémia de Waldenström por definição tem associada a si uma paraproteínemia IgM. No entanto, indivíduos com outros linfomas podem também apresentar uma gamopatia IgM (20% em leucemia linfocítica crónica, 7.1% em linfomas de zona marginal (Grunengerg & Buske, 2017).

Os sintomas característicos são provocados pelas infiltrações de células malignas na medula óssea e pela elevação dos valores de IgM, que pode provocar viscosidade sanguínea elevada e fenómeno autoimune. A fraqueza e o cansaço são muito comuns, uma vez que estes pacientes apresentam anemia, menos comum é a presença de crioglobulinas. A imunoglobulina IgM pode depositar-se na pele e no trato gastrointestinal e provocar diarreias, pode ligar-se a fatores de coagulação, plaquetas ou fibrina e provocar coagulopatias. A terapêutica apenas é aplicada em pacientes sintomáticos.

A Macroglobulinémia de Waldenström é uma doença heterogénea quer clinicamente, quer geneticamente. A mutação mais comum afeta o gene MYD88, que apresenta mutação em 90% dos pacientes. Imunofenotipicamente as células neoplásicas expressam na sua superfície imunoglobulinas usualmente IgM, por vezes IgG, em casos raros IgA, mas nunca IgD. Expressam também os antígenos típicos associados a células B, CD19, CD20, CD22, CD79a (Harris & Winter, 2012).

A terapêutica recomendada para esta patologia depende das condições em que o indivíduo se encontra. Como regra apenas os sintomáticos são tratados e a terapêutica compreende o uso de Rituximab (anticorpo monoclonal CD20), juntamente com bendamustine, ciclofosfamida e dexametazona é recomendado como tratamento primário (Grunengerg & Buske, 2017).

4.2 Leucemia Linfocítica Crónica

A Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) é uma patologia inicialmente latente de células B neoplásicas que podem circular na corrente sanguínea ou permanecer nos nódulos linfáticos. A medula óssea é afetada e noutros locais como o fígado e o baço podem também surgir células neoplásicas (Harris & Winter, 2012).

A Leucemia Linfocítica Crónica é a mais comum em adultos e a sua origem tem sido alvo de debate, estando relacionada com as células B “naïve”. O imunofenotipo de CLL é positivo para IgM/IgG com expressão de CD5, CD11, CD19, CD20, CD22, CD23, CD43 e CD79. O pico monoclonal M pode ser detetado em pacientes, com uma frequência de 3% no soro. Se for realizada imunofixação urinária, a frequência com que são detetadas cadeia leves aumenta para 69%. A taxa de sobrevivência é de 4 a 6 anos (Harris & Winter, 2012).

A maioria dos indivíduos é inicialmente assintomática, passando depois a desenvolver sintomas como fadiga, perda de peso, infeções, aumento do volume do fígado, do baço e dos nódulos linfáticos.

4.3 Doença de Franklin

A Doença de Franklin é uma patologia que apresenta malignidade em alguns casos e é caracterizada por produzir uma cadeia pesada incompleta que pode ser da tipo alfa, gama ou mu. As cadeias incompletas podem ser o resultado de mutações, e não se ligam às cadeias leves. Como não existe ligação são segregadas mais cadeias pesadas novamente incompletas.

A Doença de Franklin é também conhecida por doença de cadeias pesadas gama e é considerada como uma forma de linfoma linfoplasmócítico com segregação de cadeia pesada gama. Na forma clássica da doença podem-se encontrar linfócitos neoplásicos nos nódulos linfáticos, no trato gastrointestinal, no baço, no fígado na medula óssea e no sangue periférico. As manifestações clínicas envolvem sintomas como febre, perda de peso, fraqueza anorexia e infeções bacterianas recorrentes. Podem também ocorrer também doenças autoimunes em cerca de 25% dos casos, como artrite reumatoide, anemia hemolítica autoimune, vasculite, síndrome de Sjögren, lúpus e tiroidite. Nesta doença não se observam depósitos amiloides nem lesões líticas do osso (Harris & Winter, 2012).

As células neoplásicas presentes na doença de Franklin apresentam cadeias pesadas no citoplasma, sem cadeias leves e expressam CD79a. São também expressos CD20, CD138, no entanto nenhuma célula neoplásica é positiva para CD5 e CD19 (Harris & Winter, 2012).

4.4 Doença de cadeias pesadas mu

A doença de cadeias pesadas mu é distinta da macroglobulinemia de Waldenström. Na macroglobulinemia de Waldenström a IgM pentamérica é intacta de cadeia pesada mu e as cadeias leves kappa ou lambda são segregadas, enquanto que na doença de cadeias pesadas mu apenas é segregada cadeia mu e não existem cadeias leves. Na eletroforese e imunofixação o pico monoclonal M nas cadeias pesadas pode surgir. Esta neoplasia maligna tem semelhanças com a CLL com o envolvimento do sangue periférico, da medula óssea, fígado e baço, sem linfadenopatias. Histologicamente as cadeias pesadas mu observam-se

no interior do citoplasma com e sem cadeias leves. Apresentam falta de expressão de CD5 e CD10 (Harris & Winter, 2012).

4.5 Doença de cadeias pesadas alfa

A doença de cadeias pesadas alfa (α -HCD) é uma doença linfoproliferativa na qual é produzida uma proteína de cadeia pesada monoclonal sem a presença de cadeias leves kappa ou lambda. Existem três tipos de α -HCD, consoante o local anatómico em que se encontra: pode ser digestiva, respiratória e linfática. O tipo digestivo é sinónimo de linfoma imunoproliferativo do intestino delgado. A caracterização clínica desta doença digestiva incluem perda de peso, diarreia intermitente, dor abdominal prolongada, má absorção e por vezes obstrução intestinal (Kurimoto *et al*, 2014).

Os indivíduos com esta patologia apresentam uma proteína monoclonal M do tipo IgA com cadeia pesada alfa incompleta, sem cadeias leves como resultado de eletroforese de proteínas, imunoeletroforese e imunofixação no soro, urina, saliva e suco intestinal, o que é uma mais valia para diagnóstico (Kurimoto *et al*, 2014).

A presente patologia pode ser reversível e regredir em alguns casos ou progredir para linfoma difuso das células B aumentadas. No que respeita ao imunofenótipo são positivas para a presença de cadeias pesadas alfa no interior do citoplasma, sem cadeias leves. As células das zonas marginais do trato digestivo são positivas para CD20, mas sem expressão de CD5 e CD10 (Harry & Winter, 2012).

4.6 Linfoma MALT(Mucosa Associated Linfoide Tissue)

O linfoma MALT (Mucosa Associated Linfoide Tissue) é uma forma de linfoma das células B e está fortemente associado à infeção por *Helicobacter pilory*. A prevalência desta infeção está relacionada com a região geográfica, o status socioeconómico, o nível educacional, a idade e a ocupação (Zucca & Bertoni, 2016).

De acordo com Filip *et al* (2018), os indivíduos que apresentam gastrites provocadas por *H. pilory* estão em risco de desenvolver linfomas MALT gástricos. No entanto, é uma patologia com baixa incidência de evoluir para neoplasia, pois requer que se desenvolvam condições próprias. Os estudos realizados usando testes com *Helicobacter pilory*, em apenas um teste em treze foi capaz de estimular a proliferação das células B e a produção de IL 2 pelas células T. A infeção por *Helicobacter pilory* provoca uma transformação das células B normais em clones malignos por translocação cromossómica.

O mecanismo de neoplasia parece estar associado à estimulação antigénica das células T. Em 50% dos casos o local mais afetado é o trato gastrointestinal. No trato gastrointestinal, o estômago está envolvido em 85% dos casos. Este linfoma aparece noutros locais que não o estômago como pescoço, cabeça, glândulas salivares, mamas e tireoide, pulmões, olhos e pele (Filip *et al*, 2018).

O linfoma MALT é um dos subtipos histológicos dos linfomas gástricos primários com uma incidência superior nos homens que nas mulheres e mais elevada em indivíduos com idade entre 50 a 60 anos. Este tipo de linfoma é caracterizado por uma infiltração linfoide densa que invade e destrói as mucosas gástricas resultando numa lesão linfoepitelial indicadora de linfoma.

O linfoma MALT não apresenta antígenos específicos. O imunofenotipo deste linfoma gástrico é CD20, CD21, CD35, CD79a positivo, mas negativo para CD5, CD10, CD23. A imunoglobulina expressa pelas células neoplásicas é geralmente IgM com cadeia kappa ou lambda monoclonal. Aproximadamente um em cada três indivíduos expressa um pico monoclonal M (Harry & Winter, 2012).

A regressão do linfoma MALT é possível em estádios pouco avançados da doença, com terapia de erradicação no entanto, em alguns casos é necessário recorrer a medicação como rituximab apenas ou associado a outros medicamentos (Zucca & Bertoni, 2016).

Considerações Finais:

A fase pré-analítica é fundamental para a realização de qualquer análise clínica, é o ponto de partida que pode pôr em causa todo o processo de diagnóstico. O paciente tende a facilitar e nem sempre cumpre o que lhe é pedido na preparação para a colheita de sangue. O flebotomista tem a função de se certificar que estão reunidas as condições essenciais para a realização da colheita sem que ocorram interferências. A sua responsabilidade para com todo o processo é fundamental desde respeitar todos os procedimentos de colheita, garantindo a correta identificação do paciente e da amostra. A triagem e transporte de amostras com o uso adequado de malas térmicas, veículos de transporte, manuseamento de amostras, verificação da qualidade da amostra e centrifugação, aliquotagem e distribuição são também essenciais para a obtenção de resultados fidedignos.

A fase analítica neste relatório engloba a utilização de equipamentos e reagentes para a realização de eletroforese de proteínas séricas e imunofixação. É o resultado obtido por estas análises, juntamente com exames de radioimagiologia, que vai permitir ao clínico diagnosticar e administrar o tratamento mais adequado e o mais cedo possível em patologias que nem sempre são de fácil diagnóstico, ou que só são diagnosticadas mais tardiamente.

A sua experiência profissional em análises clínicas vem desde o ano 2000, sempre com funções nas diferentes áreas do Laboratório Clínico. Ao longo deste período realizou eletroforese de proteínas séricas e imunofixação, doseou proteínas totais na urina entre outros testes, quase diariamente e pôde compreender a importância de detetar atempadamente uma banda monoclonal e como este resultado vai beneficiar a qualidade de vida do paciente.

Bibliografia

- Al-Abdulrazzak, R. *et al.* (2017)-Diretrizes da OMS para a tiragem de sangue: boas práticas em flebotomia. World Health Organization. Injection Safety & Related Infection Control Safe Injection Global Network (SIGN) Secretariat 20 Appia Avenue – CH 1211 Geneva 27 – Switzerland. Disponível em https://www.who.int/infection-prevention/publications/Phlebotomy-portuges_web.pdf . Acesso em out 2019.
- Andrilo, A., Martins A., Ballarati C., Barbosa I., Mendes M., Melo M., Sumita N., Romano P. & P. Trindade (2010). Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. 2ª ed Barueri, SP. Minha Editora.109pp.
- Arantes, P. (2018). Órgãos Linfóides. Disponível em <https://slideplayer.com.br/slide/13007117/>. Acesso em jun 2019.
- Atkin C., Ritcher A. & E. Sapey. (2018). What is the significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance? *Royal College of Physicians-Clinical Medicine*. Vol. **18** (5):391-396.
- Barbuto J., Wastowski I., Carneiro-Sampaio M. & E. Donadi (2014). Imunologia Básica para o Clínico. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/236221052>. Acesso em jul 2020.
- Bayot & Tadi (2020). Laboratory Tube Collection. In:StatPearls.Publishing. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.gov/32310451/>. Acesso em 20/07/2020.
- Beetham R. (2000). Detection of Bence Jones protein in practice. *Ann Clin Biochem*. Vol. **37**: 563-570.
- Bossuyt, X. (2003). Separation of serum proteins by automated Capillary Zone Electrophoresis. *Clin.Chem. Lab. Med*. Vol.**41** (6):762-772.
- Bossuyt, X. (2004). Interferences in clinical capillary zone electrophoreses of serum proteins. Minireview. *Electrophoresis*. Vol. **25**:1485-1487.
- Bossuyt, X. (2006). Advances in serum protein electrophoresis. *Advances on clinical chemistry*. Vol. **42**: 43-77.
- Bottini P. (2007). Testes Laboratoriais para Avaliação do Componente Monoclonal. *Rev. Bras. Hematol. Hermoter*. Vol. **29** (1): 23-26.
- Bouayadi O., , Bensalah M.,Rahmani N., Assoufi S. & M. Choukri (2019). Serum protein electrophoresis: study of 410 electrophoretic profiles. *Pan Afr Med J*. Apr 8; 32:161. doi: 10.11604/pamj.2019.32.161.11455. eCollection 2019. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6607294/#> . Acesso em jan de 2020.
- Bowen R. & A. Remaley (2014). Interferences from blood collection tube componentes on clinical chemistry. *Biochemia Medica*. Vol. **24** (1):31-44.
- Canhas, I. (2011). Anticorpos. Disponível em www.infoescola.com/sistema-imunologico/anticorpos/. Acesso em nov 2020.

- Caquet, R. (2001). Guia Prático de Análises Clínicas. Ed. Climepsi. Paris. 468pp.
- Chan P., Chen Y. & E. Randell (2017). On the path to evidence-based reporting of serum protein electrophoresis patterns in the absence of a discernible monoclonal protein – A critical review of literature and practice suggestions. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.09.010>. Acesso em jun 2020.
- Cohen C. *et al* (2025). Light and heavy chain deposition disease associated with CH1 deletion. *Clin Kidney Jour.* Vol. **8**:237-239.
- Cornes M. *et al* (2017). Order of blood draw: Opinion paper by the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin. Chem. Lab. Med.* Vol. **55** (1):27-31.
- Cuhadar S., Atay A., Koseoglu M., Dirican A. & A. Hur (2012). Stability studies of common biochemical analytes in serum separator tubes with or without gel barrier subjected to various storage conditions. *Biochemia Medica.* Vol. **22** (2): 202-214.
- Csako G. (2012). Immunofixation Electrophoresis for identification of proteins and specific antibodies. *Methods in Molecular Biology.* Vol. **869**: 147-181.
- Csako G. (2019). Imunoelectrophoresis: A method with many faces. *Methods in Molecular Biology.* Vol. **1815**:249-268.
- Delves, P., Martin S., Burton D. & I. Roitt's (2017). Roitt's Essential Immunology. 13rd Edition, Wiley Blackwell. 578pp.
- Dias, F.(2017). Dispositivos para coleta de amostras. Newslab. Disponível em <https://newslab.com.br/dispositivos-para-coleta-de-amostras/>. Acesso em dez 2019.
- Friedel R. & H. Mattenheimer (1970). Release of metabolic enzymes from platelets during blood clotting of man, dog, rabbit and rat. *Clin Chim Acta.* Vol.**30**:37–46.
- Ferreri A., Montoto S. & U. Vitolo (2008). Lymphoplasmacytic lymphoma – Waldenstrom's magroglobulinemia. State of the art in Oncology. Disponível em <http://www.startoncology.net/professional-area/lymphoplasmacytic-lymphoma-waldenstroms-magroglobulinemia/?lang=en>. Acesso em fev 2020.
- Filip P. *et al* (2018). MAT Lymphoma: epidemiology, clinical diagnosis and treatment. *Journal of Medicine and Life.* Vol. **11**:187-193pp.
- Genzen *et al* (2017). Screening and diagnosis of monoclonal gamopathies. *Arch Pathol Lab Med.* Disponível em <http://doi:10.5858/arpa.2017-0128-CP>. Acesso em set 2020.
- Georgiou, C. *et al* (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal Bioanal Chem.* Vol.391(1): 391-403.
- Gerecke C. *et al*, (2016). Diagnosis and treatment of Multiple Myeloma. *Deutsches Ärzteblatt International.* Vol. **113**: 470-476.
- Grankvist K., Gomes R., Nybo M., Lima-Oliveira G. & A. von Meyer (2018). Preanalytical aspects on short- and long- term storage of serum and plasma.DE GRUYTER. 1-6.

- Grunenberg A., & C. Buske (2017). Monoclonal IgM Gammopathy and Waldenström's Macroglobulinemia. *Deutsches Ärzteblatt International*. Vol. **114**:745-751.
- Harris N. & W. Winter (2012). Multiple Myeloma and Related Serum Protein Disorder. An Electrophoretic Guide. Demos Medical Pub. New York. 160pp.
- Jolliff C. & C. Blessum (1997). Comparison of serum protein electrophoresis by agarose gel and capillary zone electrophoresis in a clinical setting. *Electrophoresis*. Vol. **18**:1781-1784.
- Jacobs J., van der Molen & D. Keren (2014). Relatively Restricted Migration of Polyclonal IgG4 May Mimic a Monoclonal Gammopathy in IgG4-Related Disease *Am J Clin Pathol*. Vol. **142**:76-81 Disponível em <http://dx.doi.org/10.1309/AJCP41XCVBHEQCEL>. Acesso em set 2020.
- Keren, D. (2003). Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. [S.l.] : Hodder Arnold.
- Kyle, R. (1999). Sequence of Testing for Monoclonal Gammopathies Serum and Plasma assays. *Arch. Path. Lab. Med.* Vol. **123**:114-118.
- Kyle, R. & V. Rajkumar (2006). Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *British Journal of Haematology*. **134**: 573-589.
- Kyle, R. & V. Rajkumar (2008). Multiple Myeloma. *Blood*. Vol. **111**:2962-2972.
- Kurimoto M. *et al* (2014). Severe enteropathy caused by α -Heavy Chain Disease lacking detectable M-proteins. *Internal Medicine*. Vol. **53**:581-585.
- Larsen J. *et al* (2013). Serum free light ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. **27**:941-946.
- Lee A., Cassar P., Johnston A., & S. Adelstein (2017). Clinical use and interpretation of serum protein electrophoresis and adjunct assays. *British Journal of Hospital Medicine*. Vol. **78** (2): C18-C20.
- Lima-Oliveira *et al* (2009). Controle da qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros pré-analíticos. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* vol. 45 no. 6 Rio de Janeiro dez. 2009. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S1676-24442009000600002>. Acesso em março 2020.
- Lima-Oliveira G., Lippi G., Salvagno G., Montagnana M., Pichet G. & G. Guidi (2012). Preanalytical management: serum vacuum tubes validation for routine clinical chemistry. *Biochemia Medica*. Vol. **22** (2):180-186.
- Lima-Oliveira G., Lippi G., Salvagno G., Montagnana M., Gelati M., Volanski W., Boritza K., Pichet G. & G. Guidi (2013). Effects of vigorous mixing of blood vacuum tubes on laboratory test results. *Clinical Biochemistry*. Vol. **46** :250-254.
- Lima-Oliveira G., Lippi G., Salvagno G., Pichet G. & G. Guidi (2015). Laboratory Diagnostic and Quality of Blood Collection. *J. Med. Biochem.* Vol. **34**: 288-294.

- Lima-Oliveira G., Volanski W., Lippi G., Pichet G. & G. Guidi (2017). Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. Vol. **77** (3):153-163.
- Lima-Oliveira G., Monneret D., Guerber F. & G. Guidi (2018). Sample Management for biochemistry assays: Are serum and plasma interchangeable specimens? Critical reviews in clinical laboratory science. Taylor & Francis Group. Disponível em <https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1499708> Acesso em fev 2020.
- Lippi G., Salvagno G., Lima-Oliveira G., Brocco G., Danese E., & G. Guidi (2015). Postural change during venous blood collection is a major source of bias in clinical chemistry testing. *Clin Chim Acta*. 440:164-168.
- Marshall M. (1980). Comparison of immunofixation and immunoelectrophoresis methods in the identification of monoclonal immunoglobulins in serum. *Clin Chim Acta* Vol. **104**:1-9.
- Martelli *et al* (2017). Sistema imunitário e imunidade no porco - Imunidade humoral específica (1/2) - Tipos e estrutura de Ig. Immunology Research Unit. Disponível em: https://www.3tres3.com.pt/artigos/sistema-imunitario-e-imunidade-imunidade-humoral-especifica-1-2_10960/. Acesso em nov 2020.
- McCall R. E. & C.M. Tankersley, (1993). *Phlebotomy essentials*. J.B. Lippincott Company Editora. Philadelphia. 291pp.
- McCudden, C.R., Jacobs, J., Keren, D., Caillon H., Dejoie T., & K. Andersen (2018). Recognition and management of common, rare, and novel serum protein electrophoresis and immunofixation interferences. *Clinical Biochemistry*. Vol. **55**:72-79.
- McCudden, C.R. *et al* (2018). Synoptic reporting for protein electrophoresis and immunofixation. *Clinical Biochemistry*. Vol. **51**:21-28.
- Monneret D. *et al* (2016). Comparison of a 10- vs. 15-min centrifugation time for chemical and immunochemical assays and impact on turnaround time in a hospital laboratory. *Clin Chem Lab Med*. Vol. **54**: e117–e121.
- Monneret D., A. Godmer, Le Guen R., Bravetti C., Emeraud C., Marteau A., Alkouri R., Mestari F., Dever S., Imbert-Bismut F. & D. Bonnefont-Rousselot (2016). Stability of Routine Biochemical Analytes in Whole Blood and Plasma from Lithium Heparin Gel Tubes during 6 hours Storage. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Vol. **0**:1-8.
- Morrison T., Booth R., Hauff K., Berardi P., & A. Visram (2019). Laboratory assessment of multiple myeloma. *Advances in Clinical Chemistry*. Vol. **89**: 1-58.
- Mussap M., Ponchia S., Zanimotto M., Varagnolo M. & M. Plebani (2006). Evolution of a new capillary zone electrophoresis system for the identification and typing of Bence Jones Protein. *Clinical Biochemistry* Vol. **39**:152-159.
- NCCLS (2003). Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard – Fifth Edition H3-A5 (ISBN1-56238-515-1). Vol. **23**(32). 35 pp.

- O'Connel T., Horita T. & B. Kasravi (2005). Understanding and Interpreting Serum Proteins Electrophoresis. *American Family Physician*. Vol. **71**(1):105-112.
- O'Keane, M. & S. Cunningham (2016). Evaluation of three diferente specimenn types (serum, plasma,l ithium heparin and serum gel separator) for analysis of certain analytes:clinical significance of diffences in results and efficiency in use. *Clin Chem Lab Med*. Vol. **44**(5):662-668.
- Pardini H. (2003). Electroforese de proteínas e imunofixação. Disponível em <https://www.yumpu.com/pt/document/view/14202372/eletroforese-de-proteinas-e-imunofixacao-hermes-pardini>. Acesso em jan 2020.
- Parreira J. *et al* (2014). Gamopatias Monoclonais de Significado Indeterminado: Critérios de Diagnóstico e Acompanhamento Clínico. *Acta Med Port*. Vol. **27** (5):661-664.
- Pretorius C. (2015). Screening immunofixation should replace protein electrophoresis as the inicial investigation of monoclonal gammopathy. *Clin Chem Lab Med*. DE GRUYTER Disponível em <http://doi: 10.1515/cclm-2015-0699>. Acesso em nov 2020.
- Rajkumar V. & R. Kyle (2014). Protein Electrophoresis and immunofixation for the Diagnois of Monoclonal Gammopathies. Clinical Review & Education. *JAMA Diagnostic Test Interpretation*. Vol. **312** (20): 21602161.
- Rajkumar V. *et al*. (2014). International Myeloma Working Group update criteria for the diagnosis of Multiple Myeloma. *The Lancet*. Vol. **15**:e538-e547.
- Regeniter A. & W. H. Siede (2018). Peaks and tails: Evaluation of irregularities in capillary serum protein electrophoresis. *Clinical Biochemistry*. Vol. **51**:48-55.
- Ryšavá R. (2018). AL amiloidosis: advances in diagnóstics and treatment. *Nephrology Dialysis Transplantation*. Review. 1-7pp. Disponível em <http://dx.doi:10.1093/ndt/gfy291>. Acesso em out 2020.
- Rosenberg-Hasson *et al* (2018). Effects of serum and plasma matrices on multiplex immunoassays. *Immunol Res*. 2014 May ; **58**(0): 224–233. Disponível em <http://dx.doi:10.1007/s12026-014-8491-6>. Acesso em set 2020.
- Salvagno G., Lima-Oliveira G., Brocco G., Danese E., Guidi G. & G. Luppi (2013). The order of Draw:myth or science? *Clin. Chem. Lab. Med*. Vol.**51**(12):2281-2285.
- SEBIA (2014). Hydragel IF K20 Standard mask– Instruções de uso. Sebia.
- SEBIA (2019). MINICAP THE SEBIA CAPILLARY ELECTROPHORESIS AUTOMATED SOLUTION FOR SMALL TO MEDIUM SIZE LABORATORIES. Disponível em <https://www.sebia.com/en-EN/produits/minicap>. Acesso em Jan 2020.
- Silva, R., Lopes A. & R.Faria (2008). Eletroforese de proteínas séricas:interpretação e correlação. *Rev Med Minas Gerais*. Vol.**18** (2):116-122.
- Simundic A., Cornes M., Grankvist, Lippi G., & M. Nybo (2013). Standartization of collection requirements for fasting samples fr the working group on preanalytical phase (WG-PA) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM).

Clinical Chimica Acta. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.11.008>. Acesso em mar 2020.

Smith J., Raines G., & H. Schneider (2017). A comparison between high resolution serum protein electrophoresis and screening immunofixation for the detection of monoclonal gammopathies in serum. *Clin Chem Lab Med*. Disponível em <http://doi.org/10.1515/cclm-2017-0266>. Acesso em ago 2020.

Soane, A. (2002). Atlas de Hematologia con interpretacion de histogramas y escatergramas. Abbott Diagnostics. 78 pp.

Tomaz P. *et al*, (2017). The detection of Bence Jones protein in urine by the heat test helps in diagnosis of multiple myeloma? *J. bras. Patol. Med. Lab*. Vol. **53** (1): 20-23pp.

Visconti V., (2002)-Serum Protein Electrophoresis. Interlab S.R.L. 22pp

Wechalekar A., Gillmore J. & P. Hawkins (2015). Systemic Amyloidosis. Seminar. Disponível em [http://dox.doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)01274-X](http://dox.doi.org/10.1016/s0140-6736(15)01274-X). Acesso em Out 2020.

Willson *et al* (1991). Harrison's Principles of Internal Medicine. 20th Edition. Vol 2. Ed. MacGraw-Hill, Inc. 2207 pp.

Zang Y. *et al*, (2019). Heavy Chain Deposition Disease: Clinicopathologic Characteristics of a Chinese Case Series. *AJKD*. 1-8pp. doi:10.1053/j.ajkd2019.08.

Zucca E. & F. Bertoni (2016). The spectrum of MALT Lymphoma at different sites: biological and therapeutic relevance. *Blood*. Vol. **127**(7): 2082-2092.

Anexo

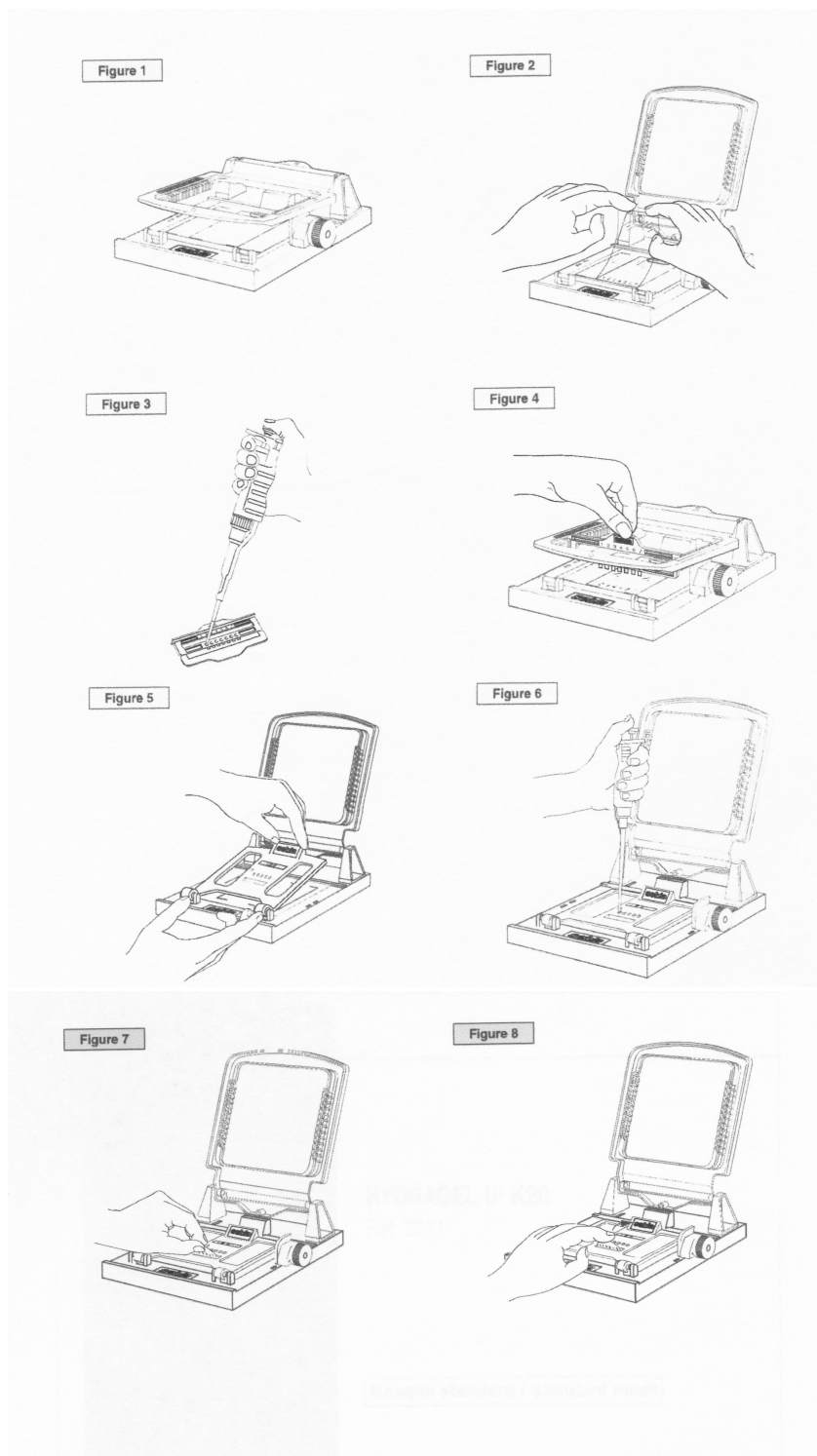


Fig. 1. –Ilustração da utilização do Kit de imunofixação Hydragel IF20 (SEBIA, 2014).

Nesta figura é possível observar algumas das diferentes etapas do processo manual de realização da imunofixação. Este kit comercial apresenta um suporte onde é colocado o gel (Figure 2) depois a amostra é pipetada para um aplicador com as pistas ELP, G, A, M, K e L e colocado sobre o gel(Figure 3 e 4). De seguida é realizada a electroforese seguindo as instruções de voltagem, tempo de corrente a aplicar. Após a migração o gel é colocado novamente no suporte e é posicionada uma máscara que vai permitir aos antissoros e fixador percorrer cada pista na totalidade (Figure 5). Depois destas etapas algo exigentes é necessário proceder à coloração e descoloração com corante negro de amido fornecido com o kit, para depois observar a existência ou ausência de bandas monoclonais.